

VŠB – Technická univerzita Ostrava
Fakulta elektrotechniky a informatiky
Katedra kybernetiky a biomedicínského inženýrství

**Srovnání laboratorních vyšetřovacích metod vysokoúčinné
kapalinové chromatografie a kapalinové chromatografie
s hmotnostní spektrometrií pro stanovení cytostatik při léčbě
pacientů s myeloidní leukémií**

Comparison of Laboratory Methods Examination High Performance
Liquid Chromatography and Liquid Chromatography with Mass
Spectrometry for the Determination of Cytostatics in the Treatment of
Patients with Myeloid Leukemia

Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Nad'a Valošková**

Studijní program: N2649 Elektrotechnika

Studijní obor: 3901T009 Biomedicínské inženýrství

Téma: Srovnání laboratorních vyšetřovacích metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie a kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií pro stanovení cytostatik při léčbě pacientů s myeloidní
Comparison of Laboratory Methods Examination High Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography with Mass Spectrometry for the Determination of Cytostatics in the Treatment of Patients with Myeloid Leukemia

Jazyk vypracování: čeština

Zásady pro vypracování:

Cílem diplomové práce je srovnání laboratorních vyšetřovacích metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) pro stanovení busulfanu. Busulfan se podává jako cytostatikum před transplantací hematopoetických progenitorových buněk.

Proměřením validačních parametrů stanovení busulfanu metodami HPLC a LC-MS/MS a jejich následným srovnáním, lze objektivně stanovit jak výhody, tak nevýhody stanovení busulfanu uvedenými metodami s ohledem na jejich optimální využití u indikovaných pacientů.

1. Literární rešerše k laboratorním metodám vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) v diagnostice se zaměřením na hematologická onemocnění.
2. Teoretický úvod do klinické části problematiky – metabolismus busulfanu, farmakokinetické a farmakodynamické vztahy, akutní myeloidní leukémie, metody a základní principy laboratorních diagnostických metod při akutní myeloidní leukémii.
3. Metody a principy vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS).
4. Kalibrace a validace kapalinové vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) pro stanovení busulfanu metodami HPLC a LC-MS/MS.
5. Realizace měření stanovení busulfanu u indikovaných pacientů.
6. Vyhodnocení a zpracování naměřených dat pokročilými statistickými metodami.
7. Stanovení senzitivity a specifity obou metod na základě pokročilých statistických analýz (opakovatelnost, reprodukovatelnost, pravdivost, robustnost, mez detekce a stanovitelnost).
8. Zhodnocení dosažených výsledků.

Seznam doporučené odborné literatury:

- [1] DONEV, Rossen. *Proteomics in Biomedicine and Pharmacology: Advances in Protein Chemistry*

and Structural Biology. Svazek 95. Academic Press, 2014, 376 s. ISBN 978-0128005958.

[2] COLEMAN, William B. a Gregory J. TSONGALIS. *Molecular diagnostics: for the clinical laboratorian*. 2nd ed. Humana Press: Totowa, N. J., c2006. ISBN 978-1588293565.

[3] CAPPIELLO, Achille a Pierangela PALMA. *Advances in the Use of Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS): Instrumentation Developments and Applications: Comprehensive Analytical Chemistry*. Svazek 79. Elsevier, 2018, 446 s. ISBN 978-0444639158.

[4] GHULAM A. SHABIR. *Practical HPLC and LC-MS Method Development and Validation Guidelines for Pharmaceutical Scientists*. Neue Ausg. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. ISBN 978-3659123528.

[5] BERDEL, W.E., et al. *Transplantation in hematology and oncology II*. Berlin: Springer, 2003. ISBN 978-3642557743.

[6] Heinemann V., Voges K., Mittermüller J., Kolb H. J., Wachholz K., Wilmanns W., Jehn U. Busulfan pharmacology in bone marrow transplantation patients, *Acute Leukemias VI*, 1997

[7] LIN, H., S. GOODIN, RK STRAIR, RS DiPAOLA a MK. GOUNDER. Comparison of LC-MS Assay and HPLC Assay of Busulfan in Clinical Pharmacokinetics Studies. *ISRN Analytical Chemistry*. 2012, Volume 2012, Article ID 198683, 5 pages. ISSN: 2090-732X. doi: <http://dx.doi.org/10.5402/2012/198683>.

[8] MOON, S. Y., et al. Quantification of Human Plasma-Busulfan Concentration by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Ann Lab Med*. 2014 Jan; 34(1): 7–14. pISSN: 2234-3806. doi: <https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.1.7>.

[9] MCKILLUP, Steve. *Statistics explained: an Introductory guide for life scientists*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 2011. ISBN 978-1107005518.

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Iveta Bryjová**

Datum zadání: 01.09.2018

Datum odevzdání: 30.04.2019

doc. Ing. Jiří Koziolek, Ph.D.
vedoucí katedry



prof. Ing. Pavel Brandštetter, CSc.
děkan fakulty

Prohlášení studenta

Prohlašuji, že tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny zdroje, literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpala.

V Praze dne 30. dubna 2019



Podpis

Poděkování

Děkuji vedoucí práce Ing. Ivetě Bryjové za podněty a připomínky k vypracování práce. Dále bych chtěla poděkovat mé školitelce Ing. Evě Klapkové, Ph.D., za odborné vedení, pomoc, podporu a cenné rady, které mi v průběhu zpracování mé práce poskytovala a také Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie FN Motol za umožnění měření.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá metodami vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS), které jsou využívány pro stanovení busulfanu při léčbě pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML). Hlavním úkolem této práce je porovnat tyto laboratorní vyšetřovací metody HPLC a LC-MS/MS a provést zhodnocení pro rutinní využití. Diplomová práce se v první části zabývá problematikou diagnostiky AML a její léčby, popisuje metabolismus busulfanu a jeho farmakodynamické a farmakokinetické vztahy, metody a principy chromatografických metod HPLC a LC-MS/MS. Praktická část diplomové práce je zaměřena na realizaci měření stanovení busulfanu u pacientů s AML pomocí HPLC a LC-MS/MS. V experimentální části byla popsána laboratorní příprava reagensů, vzorků a chromatografické podmínky jednotlivých metod HPLC a LC-MS/MS. Následně bylo provedeno stanovení hladin busulfanu u 204 patientských vzorků pomocí HPLC a LC-MS/MS. Výsledky byly statisticky zpracované v programu MS Excel a Statistica 7. V závěrečné části byly vyhodnoceny výhody a nevýhody testovaných metod jak z hlediska samotného analytického provedení metod, tak i z hlediska klinického přínosu.

Klíčová slova

AML, busulfan, transplantace hematopoetických kmenových buněk, AUC, validace, HPLC, LC-MS/MS

Abstract

This diploma thesis focuses on methods High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Liquid Chromatography with Mass Spectrometry (LC-MS/MS) which are used to determine busulfan during the treatment of patients with acute myeloid leukemia (AML). The aim of this work is to compare these methods HPLC and LC-MS/MS for clinical use. First part of the thesis describes diagnostics of AML and issues related to its treatment, namely metabolism of busulfan, its pharmacodynamics and pharmacokinetic relationships, methods, and the principles of HPLC and LC-MS/MS methods. Practical part focuses on determination of busulfan by HPLC and LC-MS/MS, which is necessary for the treatment of patient with AML. This part describes the preparation of reagents, samples, and also the chromatographic conditions for both methods. After the preparation phase the levels of busulfan were determined in 204 patients' samples by both methods HPLC and LC-MS/MS. The statistical evaluation was done using MS Excel and Statistics 7. In conclusion, advantages and disadvantages of both methods in term of analytical performance and clinical benefits were evaluated.

Key words

AML, busulfan, Hematopoietic Stem Cell Transplantation, HSCT, AUC, validation, HPLC, LC-MS/MS

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratek	9
Seznam ilustrací	11
Seznam tabulek.....	12
Seznam grafů	13
1. Úvod.....	1
2. Akutní myeloidní leukémie (AML).....	2
2.1. Epidemiologie	2
2.2. Etiologie	2
2.3. Patofyziologie nemoci.....	3
2.4. Klinické příznaky	4
2.5. Vyšetření a diagnostika	4
2.5.1. Klasifikace.....	7
2.6. Léčebné možnosti AML.....	7
2.6.1. Indukční fáze kurativní léčby akutních myeloidních leukémií	9
2.6.2. Postremisní fáze kurativní léčby s transplantací krvetvorných buněk	9
2.6.3. Podpůrná léčba	11
3. Busulfan.....	12
3.1. Obecná charakteristika a fyzikálně-chemické vlastnosti.....	12
3.2. Terapeutické indikace	12
3.3. Farmakodynamické vlastnosti.....	13
3.3.1. Mechanismus účinku léku	13
3.4. Dávkování	14
3.5. Farmakokinetické vlastnosti.....	16
3.5.1. Absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování	17
3.5.2. Variabilita v busulfanové farmakokinetice	17
3.6. Stanovení.....	18
3.7. Nežádoucí účinky	19
4. Chromatografické metody pro stanovení busulfanu – kapalinová chromatografie	21
4.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	21
4.1.1. Eluční parametry	22
4.1.2. Komponenty HPLC.....	23
4.1.3. Konvenční detektory v HPLC	24
4.2. Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií.....	26
4.2.1. Iontový zdroj	27
4.2.2. Hmotnostní analyzátor	28
4.2.3. Detektor a vyhodnocovací zařízení	30
5. Přehled prací zabývajících se HPLC a LC-MS/MS analýzou busulfanu.....	32
5.1. Aplikace HPLC metod v medicíně pro stanovení busulfanu v plazmě.....	32
5.2. Aplikace LC-MS/MS metod v medicíně pro stanovení busulfanu v plazmě	33
6. Experimentální část.....	35
6.1. HPLC – Přístroje, pomůcky a chemikálie	35
6.1.1. Přístroje	35

6.1.2.	Pomůcky.....	36
6.1.3.	Chemikálie	36
6.1.4.	Příprava reagensů a vzorků.....	36
6.1.5.	HPLC analýza – chromatografické podmínky separace a detekce.....	39
6.2.	LC – MS/MS – Přístroje, pomůcky a chemikálie	40
6.2.1.	6.2.1 Přístroje	40
6.2.2.	Pomůcky.....	40
6.2.3.	Chemikálie	40
6.2.4.	Příprava reagensů a vzorků.....	40
6.2.5.	LC-MS/MS analýza – chromatografické podmínky separace a detekce.....	42
7.	Výsledky a diskuze	45
7.1.	HPLC – VALIDACE METODY	45
7.1.1.	Kalibrace	45
7.1.2.	Opakovatelnost.....	45
7.1.3.	Reprodukovatelnost.....	46
7.1.4.	Správnost (Bias)	47
7.1.5.	Mez detekce a mez kvantifikace	47
7.1.6.	Výtěžnost.....	49
7.1.7.	Robustnost.....	49
7.2.	LC – MS/MS – VALIDACE METODY	52
7.2.1.	Kalibrace	52
7.2.2.	Opakovatelnost.....	52
7.2.3.	Reprodukovatelnost.....	53
7.2.4.	Správnost (Bias)	54
7.2.5.	Mez detekce a kvantifikace	54
7.2.6.	Výtěžnost.....	54
7.2.7.	Robustnost.....	54
7.3.	Statistické porovnání metod HPLC a LC-MS/MS	57
7.3.1.	Testovaný soubor patientských dat.....	57
7.3.2.	Výsledky HPLC a LC-MS/MS.....	57
7.3.3.	Mezilaboratorní porovnání	71
8.	Závěr.....	73
9.	Použitá literatura.....	74

Seznam použitých symbolů a zkratek

ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AML	Akutní myeloidní leukemie
AUC	Plocha pod křivkou (Area Under the Curve) [ng/h.ml]
BMT	Transplantace kostní dřeně (Bone Marrow Transplantation)
CBC	Kompletní krevní obraz (Complete Blood Count)
CBT	Transplantace pupečnickové krve (Cord Blood Transplantation)
CID	Kolizně indukovaná disociace (Collision-Induced Dissociation)
CLL	Chronická lymfatická leukémie
CML	Chronická myeloidní leukémie
CNS	Centrální nervový systém
CR	Kompletní remise (Complete Remission)
C _{ss}	Průměrná plazmatická koncentrace léčiva v plazmě [ng/ml]
CSF	Cerebrospinální tekutina (Cerebrospinal Fluid)
CV	Variační koeficient (Coefficient of Variation) [%]
D5W	5% roztok dextrózy ve vodě
DAD	Detektor s diodovým polem (Diode Array Detector)
ECD	Elektrochemický detektor (Electrochemical Detector)
ESI	Ionizace elektrosprejem (ElectroSpray Ionization)
FAB	Klasifikace akutní myeloidní leukémie dle francouzských, amerických a britských odborníků
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace (Fluorescence in Situ Hybridization)
FLD	Fluorimetrický detektor
FT-ICR	Iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier Transform Ion-Cyclotron Resonance)
FT-OT	Elektrostatická iontová past (Electrostatic Ion Trap)
GIT	Gastrointestinální trakt
HLA	Lidský leukocytární antigen (Human Leucocyte Antigen)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HSCT	Transplantace hematopoetických kmenových buněk (Hematopoietic Stem Cell Transplantation)
HVOD	Hepatické veno-okluzní onemocnění (Hepatic Veno-Occlusive Disease)
IS	Vnitřní standard
IT	Iontová past (Ion Trap)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistotu a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
IV	Intravenózní
LC	Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LC – MS/MS	Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií – (Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

LL	Extrakce kapalina – kapalina (Liquid-Liquid)
LOD	Limit detekce (Limit of Detection)
LOQ	Limit kvantifikace (Limit of Quantitation)
MALDI	Laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
MDS	Myelodysplastický syndrom
MF	Mobilní fáze (Mobile Phase)
MRM	Monitorování vybraných reakcí (Multiple Reaction Monitoring))
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
NL	Sken neutrálních ztrát (Neutral Loss)
NP	Normální fáze (Normal Phase)
PBPC	Kmenové (progenitorové) buňky z periferní krve (Peripheral Blood Progenitor Cells)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PDA	Detektor s diodovým polem (Photodiode Array)
PI	Sken produktových iontů (Product Ion scan)
PK	Farmakokinetické parametry
PR	Parciální remise
PS	Sken iontů prekursoru (Precursor ion Scan)
QqQ	Trojité kvadrupól (Triple Quadrupole)
RP	Reverzní fáze (Reverse Phase)
SD	Směrodatná odchylka (Standard Deviation)
SF	Stacionární fáze
SPE	Extrakce na pevné fázi (Solid-Phase Extraction)
SRM	Sken vybraných reakcí (Selected reaction monitoring)
TBI	Celkové ozáření těla (Total Body Irradiation)
TCC	Termostat kolony (Thermostatted Column Comparement)
TDM	Terapeutické monitorování léků (Therapeutic Drug Monitoring)
TOF	Průletové analyzátory (Time Of Flight)
UV	Ultrafialová oblast spektra (Ultraviolet)
VIS	Viditelná oblast spektra (Visible)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
diff	diferenciální krevní rozpočet
ppm	jedna miliontina (Parts per million)

Seznam ilustrací

Obrázek 2.1 Charakteristický vývoj myeloidní kmenové buňky u AML	3
Obrázek 2.2 Zdravá kostní dřeň (vlevo), nádorové blasty v kostní dřeni AML (vpravo).....	4
Obrázek 3.1 Strukturní vzorec busulfanu.....	12
Obrázek 3.2 Znázornění alkylačního účinku cytostatik a propletení křížových vazeb DNA	14
Obrázek 4.1 Separace dvousložkové směsi v chromatografickém systému	22
Obrázek 4.2 Kvalitativní a kvantitativní charakteristiky chromatografického procesu	22
Obrázek 4.3 Základní instrumentální schéma HPLC	23
Obrázek 4.4 Schéma detektoru s diodovým polem.....	25
Obrázek 4.5 Základní instrumentální schéma tandemové hmotnostní spektrometrie.....	26
Obrázek 4.6 Schéma zobrazující základní princip ionizace elektrosprejem	27
Obrázek 4.7 Zjednodušené schéma laserové desorpce/ionizace	28
Obrázek 4.8 Trojitý kvadrupólový hmotnostní spektrometr	29
Obrázek 4.9 Možnosti nastavení trojitého kvadrupólu	30
Obrázek 4.10 Detektory MS/MS.....	31
Obrázek 6.1 HPLC sestava Agilent 1260 Infinity.....	35
Obrázek 6.2 Kolona Supelcosil LC-18 10 cm x 4,6 mm, 5 µm	35
Obrázek 6.3 Evaporátor.....	38
Obrázek 6.4 Podmínky HPLC analýzy	39
Obrázek 6.5 Průběh HPLC analýzy: patientský vzorek	39
Obrázek 6.6 LC-MS/MS s trojitým kvadrupólem Agilent 6470.....	40
Obrázek 6.7 Podmínky LC-MS/MS analýzy	43
Obrázek 6.8 Chromatogram busulfanu	43
Obrázek 6.9 Chromatogram busulfanu-d8	44
Obrázek 7.1 Kalibrační křivka busulfanu metodou HPLC	45
Obrázek 7.2 Rozdílnost AUC metod HPLC a LC-MS/MS.....	63

Seznam tabulek

Tabulka 3.1 Doporučená dávka přípravku busulfanu	15
Tabulka 3.2 Klinicky významné PK	17
Tabulka 6.1 Hladiny kontrolních roztoků busulfanu pro HPLC analýzu.....	37
Tabulka 6.2 Příprava kontrol busulfanu pro HPLC analýzu	37
Tabulka 6.3 Příprava kalibračních roztoků pro busulfan pro HPLC analýzu	38
Tabulka 6.4 Hladiny kontrolních roztoků busulfanu pro LC-MS/MS analýzu.....	41
Tabulka 6.5 Příprava kalibračních roztoků busulfanu pro LC-MS/MS analýzu	42
Tabulka 6.6 Vybrané MRM přechody	43
Tabulka 7.1 HPLC – Opakovatelnost busulfanu.....	46
Tabulka 7.2 HPLC – Reprodukovatelnost busulfanu.....	47
Tabulka 7.3 Hodnoty výšek píků naměřených koncentrací	48
Tabulka 7.4 Hodnoty výšek píků naměřených blanků	49
Tabulka 7.5 HPLC – Naměřené koncentrace vzorků skladovaných v lednici	50
Tabulka 7.6 HPLC – Naměřené koncentrace vzorků skladovaných v mrazáku	50
Tabulka 7.7 HPLC – Naměřené koncentrace vzorků skladovaných v hlubokomrazicím boxu	51
Tabulka 7.8 LC-MS/MS – Opakovatelnost busulfanu.....	53
Tabulka 7.9 LC-MS/MS – Reprodukovatelnost busulfanu	54
Tabulka 7.10 LC-MS/MS – Naměřené koncentrace vzorků skladovaných v lednici	55
Tabulka 7.11 LC-MS/MS – Naměřené koncentrace vzorků skladovaných v mrazáku	55
Tabulka 7.12 LC-MS/MS – Naměřené koncentrace vzorků skladovaných v hlubokomraz.	56
Tabulka 7.13 HPLC a LC-MS/MS – naměřené koncentrace busulfanu a vypočítané AUC.....	58
Tabulka 7.14 Popisné výběrové statistiky koncentrací busulfanu.....	64
Tabulka 7.15 Wilcoxonův párový test – porovnání metod HPLC a LC-MS/MS	67
Tabulka 7.16 Spearmanův korelační koeficient HPLC a LC-MS/MS	67
Tabulka 7.17 Popisné výběrové statistiky AUC naměřených metodou HPLC a LC-MS/MS	68
Tabulka 7.18 Párový t-test – porovnání metod HPLC a LC-MS/MS dle AUC	71
Tabulka 7.19 Mezilaboratorní porovnání HPLC.....	71
Tabulka 7.20 Mezilaboratorní porovnání LC-MS/MS.....	72

Seznam grafů

Graf 7.1 Regresní přímka závislosti výšky píku na koncentraci busulfanu	48
Graf 7.2 Kalibrační křivka busulfanu pro metodu LC-MS/MS	52
Graf 7.3 Krabicové grafy koncentrací busulfanu naměřených HPLC a LC-MS/MS.....	65
Graf 7.4 Histogram testovaného souboru koncentrací busulfanu naměřených HPLC.....	66
Graf 7.5 Histogram testovaného souboru koncentrací busulfanu naměřených LC-MS/MS	66
Graf 7.6 Regresní analýza korelace metod HPLC a LC-MS/MS.....	68
Graf 7.7 Krabicové grafy AUC HPLC a LC-MS/MS	69
Graf 7.8 Histogram testovaného souboru AUC stanovených z měření HPLC	70
Graf 7.9 Histogram testovaného souboru AUC stanovených z měření LC-MS/MS.....	70

1. Úvod

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapalinová chromatografie s hmotnostní tandemovou spektrometrií (LC-MS/MS) jsou analytické separační metody, které slouží k přesnému a správnému stanovení obsahu složky ve vzorku i za výskytu směsi látek jiných. V dnešní době se jedná o jedny z nejvyužívanějších technik v mnoha odvětvích lidské činnosti, přičemž v oborech laboratorní diagnostiky jsou zcela nenahraditelné pro analýzu látek dědičných metabolických poruch, toxikologie a terapeutického sledování léků (TDM), např. pro TDM busulfanu v plazmě. Busulfan je bifunkční alkylační cytostatikum, které se využívá pro jeho protinádorové účinky k dlouhodobé regulaci počtu leukocytů. V současné době se běžně používá v předtransplantačních režimech zejména u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML), kteří podstupují transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT).

Cílem této práce je porovnat laboratorní vyšetřovací metody HPLC a LC-MS/MS pro rutinní využití. Následným stanovením hladin busulfanu u patientských vzorků pomocí HPLC a LC-MS/MS vyhodnotit výhody a nevýhody testovaných metod, a to jak z pohledu analytického provedení metod, tak z pohledu klinického přínosu.

Kapitola 2 pojednává o akutní myeloidní leukémii (AML), problematice diagnostiky a její léčby. Další kapitola popisuje metabolismus busulfanu a jeho farmakodynamické a farmakokinetické vztahy. Popis je zaměřen na cytostatikum, které je následně analyzováno chromatografickými metodami u pacientů s AML. V Kapitole 4 jsou uvedeny metody a principy vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS), které jsou v práci použity ke stanovení busulfanu v patientských vzorcích. Pátá kapitola se věnuje přehledu prací zabývajících se HPLC a LC-MS/MS analýzou busulfanu v klinické praxi.

Experimentální části se věnuje 6. kapitola, která je zaměřena na realizaci měření stanovení busulfanu u pacientů s AML pomocí HPLC a LC-MS/MS. Jsou zde uvedeny laboratorní postupy přípravy reagensů a vzorků a chromatografické podmínky jednotlivých metod HPLC a LC-MS/MS. V kapitole sedm jsou vyhodnoceny výsledky kalibrace a validace použitých metod. Dále jsou zde uvedeny výsledky statistického porovnání stanovení hladin busulfanu u 204 patientských vzorků pomocí HPLC a LC-MS/MS a v neposlední řadě výsledky mezilaboratorního porovnání. Výsledky statistického porovnání byly zpracovány v programu MS Excel a vyhodnoceny v programu Statistica 7.

2. Akutní myeloidní leukémie (AML)

Akutní myeloidní leukemie (AML) je agresivní zhoubné nádorové onemocnění krvetvorby, které vzniká následkem zablokování hematopoetické (krvetvorné) kmenové buňky. V důsledku vzniklých mutací nedochází k diferenciaci v další krevní elementy, zvyšuje se přežití a proliferace málo zralých buněk (blastů) v kostní dřeni. Akumulované abnormální (leukemické) blasty mohou prostupovat z jedné, více nebo všech myeloidních linií až do periferní krve, a tím tak způsobit fatální následky pro lidský organismus [1–4].

Tento typ rakoviny kostní dřene a krve má obvykle rychlý spád, pokud není léčen. V dnešní době se jedná o nejběžnější typ akutní leukémie u dospělých. AML se také nazývá akutní myelogenní leukémie, akutní myeloblastická leukémie a akutní nelymfocytární leukémie. Existuje řada podtypů z důsledku heterogenity daného maligního onemocnění, avšak v zásadě se jedná o množinu individuálních onemocnění [3, 5].

U AML se nevytvářejí nádorová ložiska, ale výskyt nezralých krevetvorných buněk (myeloblastů) lze zjistit mikroskopicky z kostní dřene či krevního oběhu aj. Dosavadní léčebné prostředky postihují v různé míře i buňky normální, protože neumožňují omezit selektivní ničení pouze na buňky nádorové. Proto je důležitou součástí léčebných procesů AML podpůrná terapie – mj. transfúze krevních destiček a červených krvinek, antiinfekční léčba [1, 2, 6, 7].

2.1. Epidemiologie

AML jsou častá, vysoce zhoubná onemocnění, která jsou odpovědná za velké množství úmrtí souvisejících s onkologickým onemocněním. Tvoří až 80 % akutních leukémií u dospělých a 15–20 % u dětí [8, 9].

Jejich výskyt se však výrazně liší v závislosti na věku, nejčastěji postihuje především starší jedince nad 60 let (medián věku nemocných je 65 let). Výskyt nových případů AML v padesátém roce věku postihne průměrně 3,5/100 000 obyvatel, v sedmdesáti letech je to již 15/100 000 a po dosažení osmdesáti let onemocní touto nemocí dokonce 22/100 000 obyvatel [9].

Z vědeckých poznatků vyplývá, že v posledních desetiletích došlo k pozitivnímu nárůstu prognózy u mladších pacientů s AML, převážně díky zlepšení podpůrné péče, intenzivní chemoterapie a zařazení alogenní transplantace krevetvorných buněk do léčby AML [9].

2.2. Etiologie

Příčiny vzniku, kdy se krevetvorná buňka změní na nádorovou je u většiny případů AML nejasná, protože v mnoha případech se nejedná o chromozomální poruchu či genetickou mutaci uvnitř buňky [6, 8].

Uvádí se, že samotný rozvoj nemoci AML závisí také na určitých rizikových faktorech zevního prostředí. Mezi hlavní aktivátory patří vliv životního prostředí, styk s určitými chemikáliemi např. benzen, deriváty benzenu – tricyklické uhlovodíky, pesticidy, herbicidy. Příčinou nemoci může být

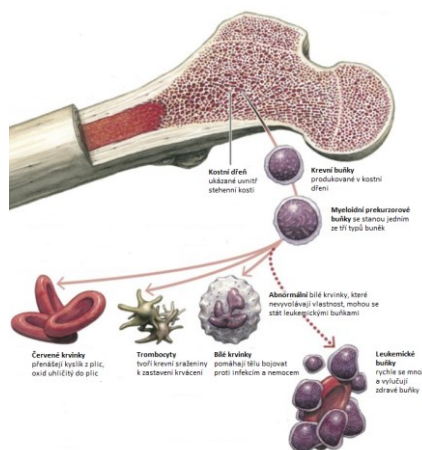
mimo jiné cytotoxická léčba (cytostatika – alkylační látky, inhibitory topoizomerázy II, radioterapie) nebo se může AML vyvíjet z jiného hematologického onemocnění – myelodysplastického syndromu (MDS), chronického myeloproliferativního onemocnění a chronické lymfatické leukémie (CLL). U těchto tří případů chronické leukémie je AML označována jako sekundární [6, 8].

AML mohou indukovat i genetické predispozice, které činí organismus daného jedince citlivým k působení vyvolávajícího faktoru – např. nemocní s Downovým (trizomie 21) či Klinefelterovým syndromem (XXY) a Patauovým syndromem (trizomie 13) mají větší náchylnost k tomuto typu leukémie [6, 8].

2.3. Patofyziologie nemoci

AML dospělých je typ zhoubného nádorového onemocnění, u kterého kostní dřeň vytváří abnormální myeloblasty (typ bílých krvinek), červené krvinky nebo krevní destičky [5].

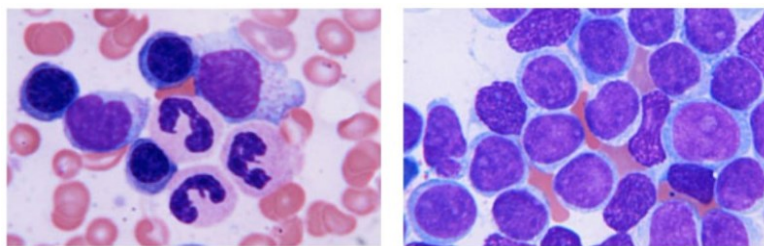
U zdravého člověka se v kostní dřeni tvoří krevní buňky (nezralé buňky), které se stanou zralými krevními buňkami v průběhu vývoje daného jedince. V krvi se může stát kmenová buňka myeloidní nebo lymfoidní. Lymfoidní kmenová buňka se stává bílými buňkami (není však případem AML, ale akutní lymfoblastické leukémie (ALL)). Z myeloidní linie kmenových buněk se stávají tři typy zralých krevních buněk – erytrocyty (červené krvinky), trombocyty (krevní destičky), monocytů (typy bílých krvinek) a neutrofilů (cytoplazmatické granuly bílých krvinek). Hlavním projevem AML je, že dochází k zastavení vyžívání daných myeloidních prekursorových buněk na úrovni blastů (viz Obrázek 2.1) [5].



Obrázek 2.1 Charakteristický vývoj myeloidní kmenové buňky u AML [10]

Myeloidní kmenové buňky se nejčastěji stávají typem nezralých bílých krvinek označovaných myeloblasty. Myeloblasty v AML jsou typické svou nevyzrálostí ve zdravé bílé krvinky a svou abnormalitou. Méně často se u AML stává velké množství kmenových buněk abnormálními trombocyty a červenými krvinkami. Tyto nevyzrálé abnormální krevní elementy se také nazývají leukemické buňky nebo blasty (Obrázek 2.2). Hromadí se v buňce kostní dřene a krvi, utlačují zdravé bílé krvinky, červené krvinky, krevní destičky a tím dochází i k selhání jejich funkcí. Takto postižené krvetvorné buňky se stávají pro organismus nádorovými, jsou funkčně neplnohodnotné, jejich hromadění v kostní dřeni vede k útlaku fyziologické krvetvorby. Leukémie se mohou rozšířit mimo

periferní krev do jiných částí těla, včetně centrálního nervového systému (mozku a míchy), kůže a dásní [3, 5, 7, 11].



Obrázek 2.2 Zdravá kostní dřeň (vlevo), nádorové blasty v kostní dřeni AML (vpravo) [12]

2.4. Klinické příznaky

Klinické příznaky, s nimiž pacient vyhledá lékaře, jsou převážně způsobené nadbytkem blastů a tím i narušenou fyziologickou funkcí krvetvorby, vyplývající z nedostatku zdravých krevních buněk, které nejsou schopny plnit svou úlohu v organismu. Počáteční symptomy jsou velmi nespecifické a zdravotní stav nemocného se velmi rychle zhoršuje [6].

Možné projevy příznaků AML vyplývající z nedostatku erytrocytů, trombocytů a sníženého či zvýšeného počtu leukocytů jsou [tato subsekce byla zpracována podle: 1, 3, 11]:

- Projevy anemického syndromu – únava, slabost, bledost, snížený fyzický výkon, u starších nemocných ischemické bolesti na hrudi;
- Projevy bez prokazatelné infekce – teploty nebo horečky;
- Infekční projevy vyplývající z granulocytopenie – záněty horních cest dýchacích, stomatitidy a závažné angíny (nedostatečně reagující na antibiotika, neboť je defektní nespecifická imunita);
- Krvácivé projevy vyplývající z trombocytopenie – krvácení do kůže (petechie), snadná tvorba modřin, krvácení ze sliznic (epistaxe), krvácení z dásní (menometroragie), silnější krvácivé projevy z dýchacího nebo gastrointestinálního traktu (GIT) či centrálního nervového systému (CNS);
- Příznaky vyplývající z leukostázy – extrémní počet leukocytů přesahující $50000 \cdot 10^9/l$ může vést k manifestaci syndromu leukostázy (projevuje se sníženým prokrvením plic a mozku, které vede k dušnosti, respirační insuficienci, zmatenosti, bolestem hlavy, poruchami zraku).

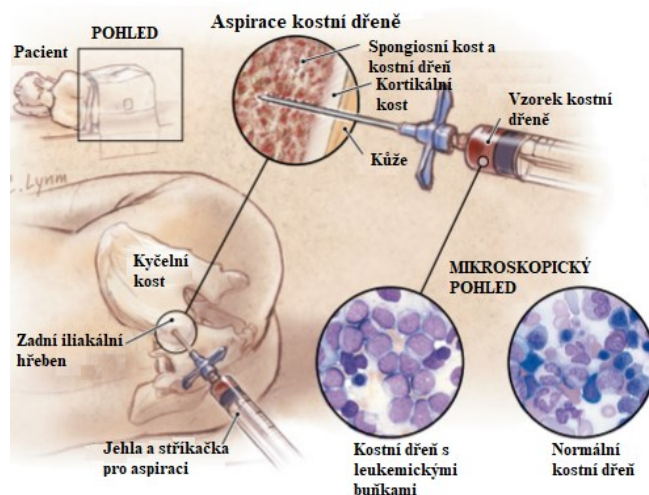
2.5. Vyšetření a diagnostika

Nemocného k lékaři přivedou výše uvedené příčiny anebo je objevení AML lékařem náhodné např. z odběru krve [tato subsekce byla zpracována podle: 1, 4, 5, 13–16].

Typy vzorků používané k testování akutní myeloidní leukémie:

- Vzorky krve – krev odebrána ze žíly v loketní jamce;
- Vzorky kostní dřeně – získány ze dvou testů, které se obvykle provádějí ve stejnou dobu v následujícím pořadí (Obrázek 2.3):

- aspirace kostní dřeně – vzorky odebírány z hrudní kosti (pacient leží na boku nebo břiše) pomocí duté jehly a injekční stříkačky,
 - biopsie kostní dřeně – vzorky odebírány ze zadní strany pánevní (kyčelní) kosti pomocí dlouhé duté jehly zatlačené dolů do kosti;
- Cerebrospinální tekutina (CSF) – mozkomíšní mok odebírán tzv. lumbální (bederní) punkcí (pacient leží na boku nebo může sedět) pomocí malé duté jehly vsunuté mezi obratle do oblasti kolem míchy (pro testování AML se používá jen v případě, pokud pacient nemá příznaky, které by mohly být způsobeny leukemickými buňkami šířícími se do mozku a míchy).



Obr. 2.1 Aspirace kostní dřeně a biopsie [15]

Laboratorní testy používané k diagnostice a klasifikaci akutní myeloidní leukemie:

Kompletní krevní obraz a nátěr periferní krve (CBC) – test měří množství krevních elementů v krvi (buněk) a provádí se zároveň s diferenciálním krevním rozpočtem (diff), který se zabývá počty různých typů bílých krvinek. Test je vyhodnocován pomocí mikroskopu, protože diferenciální krevní obraz z analyzátoru může blasty posoudit jako monocyty.

Při diagnóze akutní leukemie je obecně vyžadováno minimálně 5 % jaderných buněk v kostní dřeni nebo krvi. Abnormální počet bílých krvinek dělá nemoc pacienta závažnější, nicméně zvýšený počet bílých krvinek v periferní krvi se individuálně liší. U některých pacientů může být počet bílých krvinek normální a u některých dokonce i snížený.

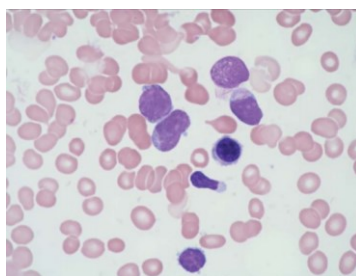
Pro akutní leukémii jsou také typické i ojediněle vyzrálé granulocyty, avšak vývojová stadia myelocytů, metamyelocytů a granulocytů jsou charakteristické pro chronickou myeloidní leukémii. Pokud nejsou výsledky z periferního krevního obrazu u stanovené diagnózy zřetelné, konečná diagnóza je určena pomocí cytologického vyšetření, u níž je požadováno ≥ 20 % myeloidních blastů v aspirátu kostní dřeně nebo periferní krvi.

Resumé hematologických a genetických vyšetření indikovaných při počáteční diagnostice AML:

- **Cytochemie** – buňky jsou vystaveny chemickým barvivům, které reagují pouze s některým typem leukemických buněk a určují jaké typy buněk jsou přítomny (např. jedna barva dokáže rozlišit

buňky AML, jejichž granule se objevují pod mikroskopem jako černé skvrny, oproti buňkám ALL, které jejich změnu barvy nezpůsobují).

- **Průtoková cytometrie a imunohistochemie** – testy se používají k přesnějšímu určení liniové příslušnosti a imunofenotypu – třídění leukemických buněk (konkrétních epitopů) podle látek (antigenů, protilátky značené fluorochromy) v cytoplazmě a na membráně blastů čili na jejich povrchu (jaderné buňky mohou být tvořeny odlišnými antigeny dle jejich zralosti a druhu buňky, ze které vznikly).
- **Průtoková cytometrie** – vzorky kostní dřeně a krve jsou ošetřeny speciálními protilátkami (bílkovinami imunitního systému), které se na vzorku buněk drží pouze za přítomnosti uvedených obsažených protilátek. Takto ošetřený vzorek je vystaven laserovým paprskem. V případě shody protilátek, laserové světlo způsobí jejich fluorescenci, kterou lze měřit a analyzovat pomocí počítače.
- **Imunohistochemické testy** – stejný princip jako u průtokové cytometrie, avšak analýza vzorků je provedena pomocí mikroskopu.
- Cytogenetika – pomocí mikroskopu jsou pozorovány početní a strukturální odchylky chromozomů buněk AML (viz kapitola 2.7). Nevýhoda testu je, že leukemické buňky musí dozrávat v laboratořích 2–3 týdny před provedením testu, z důvodu nemožnosti jejich okamžitého prohlížení.
- **Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)** – vzorek je testován pomocí speciálního fluorescenčního barviva, které se připojí k jednotlivým genům nebo částem singulárních chromozomů a pomocí mikroskopu se zjišťují jejich změny (translokace). Narozdíl cytogenetickému testování mohou být vzorky krve nebo kostní dřeně prohlíženy v době, aniž by testované buňky rostly v laboratoři. Nevýhodou je, že jsou hledány pouze určité změny genů nebo chromozomů, tudíž musí být předem určeno, které změny budou testem podrobeny.
- **Polymerázová řetězová reakce (PCR)** – jedná se o velmi citlivý test, kterým jsou získány informace o některých změnách genů a chromozomů pouze v několika jejich buňkách a pomáhá tak při nalezení malého počtu buněk leukémie ve vzorku (například po léčbě). Nevýhoda je stejná jako u metody FISH.



Obr. 2.2 Vyšetření kostní dřeně AML, nátěr aspirátu kostní dřeně, panoptické barvení, zvětšení 1000x. V horní polovině tři myeloidní blasty, jeden s vícečetnými Auerovými tyčemi, rozpadající se blast s vícečetnými Auerovými tyčemi, dále dva lymfocyty, jeden erythroblast [1]

Část vzorku aspirátu kostní dřeně se natírá na podložní sklo k cytochemickému a cytologickému vyšetření. Další část vzorku se smísí s protisrážlivým médiem a odesílá se k cytogenetickému, molekulárně genetickému a imunofenotypizačnímu vyšetření (Obrázek 2.4).

Imunofenotypizace hraje důležitou roli při rozlišení jednotlivých typů ALL a některých typů AML M0, a také je typickým indikátorem při stanovení podtypu AML M7 dle FAB klasifikace. Naopak

molekulárně genetické vyšetření umožňuje morfologickou diagnózu podtypů AML M1 až M6 (Kapitola 2.5.1), při níž je stanovena přítomnost granul, Auerových tyčinek a cytochemické reakce prokazující myeloperoxidázu a nespecifickou esterázu.

2.5.1. Klasifikace

Na základě vyhodnocení výsledků morfologických, imunofenotypických, cytogenetických vyšetření a molekulárních charakterizací je stanovena diagnóza AML, která je v praxi klasifikována do podtypů dle dvou hlavních systémů [1, 11, 17, 18].

První představuje klasifikaci AML dle francouzských, amerických a britských odborníků z roku 1976 (FAB), kteří rozdělili AML na podtypy M0 až M7 (Tabulka 2.1). Navržená klasifikace byla založena podle morfologických vlastností leukémie čili typu leukemické buňky a její zralosti [7, 17, 18]. Podtypy AML M0 až M5 jsou specifické ve svých nezralých formách bílých krvinek. M6 je typická svými velmi nezralými formami červených krvinek, zatímco M7 je charakteristická nezralými buňkami, které tvoří trombocyty [7].

Tabulka 2.1: Klasifikace akutní myeloidní leukémie podle FAB [7]

Podtyp FAB	Název
M0	Nediferenciovaná akutní myeloblastická leukémie
M1	Akutní myeloblastická leukémie s minimálním
M2	Akutní myeloblastická leukémie s dozráváním
M3	Akutní promyelocytární leukémie (APL)
M4	Akutní myelomonocytární leukémie
M4 eoizin.	Akutní myelomonocytární leukémie s eozinofilií
M5	Akutní monocytární leukémie
M6	Akutní erytroidní leukémie
M7	Akutní megakaryoblastická leukémie

Druhý systém zohledňuje kromě morfologie mnoho dalších faktorů, o kterých je nyní známo, že ovlivňují prognózu a mají terapeutický význam. Systém klasifikace AML byl následně revidován skupinou patologů a kliniků Světové zdravotnické organizace (WHO) a naposledy byl aktualizován v roce 2016. Snahou je lépe klasifikovat AML dle klinických a imunofenotypizačních kritérií a současně obsahovat i nejnovější poznatky v oblasti genetiky. Prvky z FAB klasifikace, z níž vyvstává, byly zachovány [1, 5, 7].

2.6. Léčebné možnosti AML

Při určení diagnózy AML je zapotřebí zvážit, zda pacient bude léčen s kurativním nebo pouze s paliativním záměrem. Výběr léčby závisí na typu hematologickém onemocnění AML, celkovém stavu pacienta, jeho věku a komorbiditě. Mladší pacienti než 60–65 let jsou zpravidla léčeni intenzivně s kurativním záměrem, avšak obecně platná doporučení neexistují a konečné stanovisko o intenzitě léčby se odvíjí od ošetřujícího týmu ve spolupráci s pacientem samotným [6, 16].

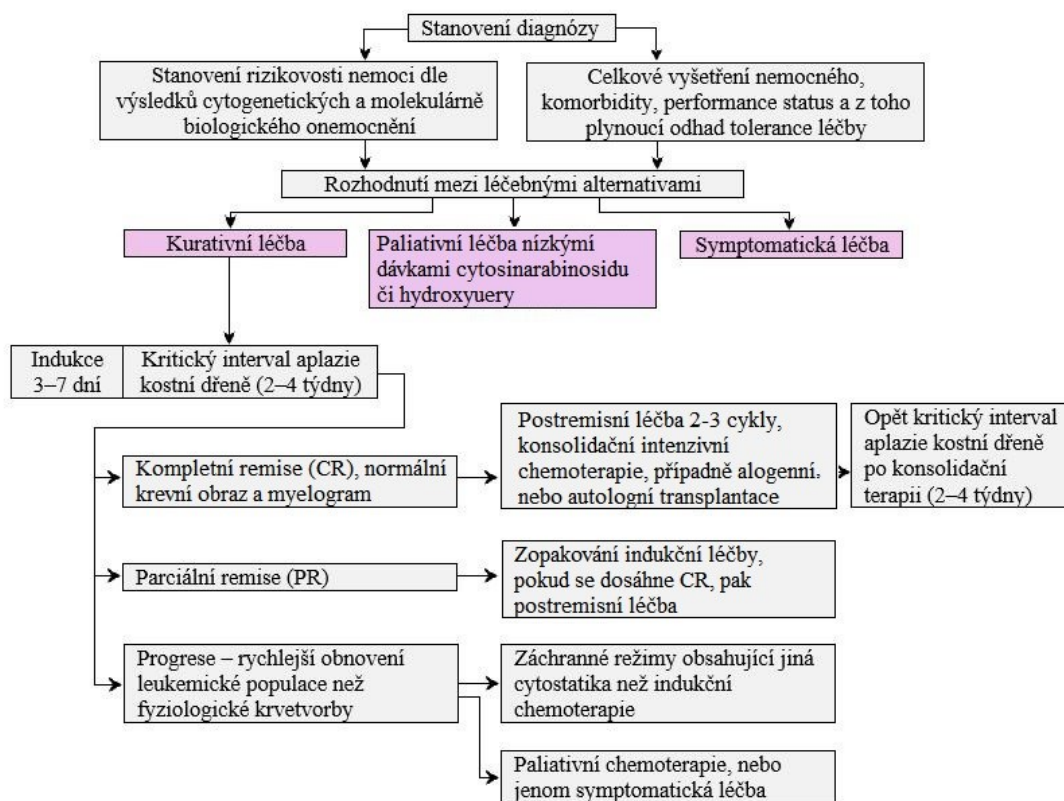
Před zahájením léčby je také nutno rozhodnout, zda pacient bude léčen bezodkladně v den stanovení

diagnózy, nebo bude léčba odložena z důsledku dalšího cytogenetického šetření (statim do 1 týdne) u sporných případů [6, 16].

Bezodkladné zahájení léčby je však nezbytné u mladších pacientů a u případů s akutní promyelocytární leukemií při počtu leukocytů převyšující $> 50 \cdot 10^9/l$, nebo s pokročilou roztroušenou intravaskulární koagulací. Pacientům hrozí nebezpečí akutního úmrtí na krvácení do CNS. Dále jsou zde zahrnuti pacienti, u kterých došlo k poškození orgánů v důsledku hyperleukocytárního syndromu nebo infiltrace, kdy počet blastů $> 100 \cdot 10^9/l$, nebo při typu AML M4 a AML M5 dle FAB klasifikace [6].

U ostatních případů AML může být časová prodleva při rozhodnutí léčby delší a lékař či tým lékařů, má tak možnost zvážit léčebnou strategii a vybrat tak z následujících možností (Schéma 2.1) [6].

Schéma 2.1: Zjednodušený léčebný postup u akutních myeloidních leukémií [6]



Remise dosáhne až 80 % pacientů mladších 55–60 let, avšak u pacientů starších je úspěch přežití poloviční. Celkové přežití u mladších pacientů se pohybuje okolo 50 % a u starších kolem 15 %. V případě provedení alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk přežívá bez selhání (EFS) po třech letech 40–60 % nemocných postihnutých AML [1, 16].

2.6.1. Indukční fáze kurativní léčby akutních myeloidních leukémií

Kurativní léčba u AML má dvě fáze. První fáze kurativní léčby je indukční, kdy jejím úkolem je snížit nádorovou populaci až pod hranici morfologického stanovení včetně dosažení normalizace krevního obrazu, regenerace fyziologické krvetvorby a docílit tak kompletní remise onemocnění [6].

U standardní indukční chemoterapie jsou podávána cytostatika s ověřeným režimem (7+3). Po dobu sedmi dnů je u dospělých pacientů aplikován cytosinarabinosid v kontinuální infúzi tří dnů (24 hodin) idarubicinu nebo daunorubicinu. U pacientů mladších 46 let je podáván vysokodávkovaný cytarabin s idarubicinem nebo daunorubicinem. K dosažení kompletní remise se na rozdíl od dětských pacientů aplikují 1–2 bloky standardní indukční chemoterapie [16].

Obvyklá léčba u dětských pacientů AML je u dětí v České republice jednotná. Česká republika je členem AML – BFM mezinárodní pracovní skupiny a léčí děti ve společných klinických studiích. Léčebným standardem je aplikace 4–5 bloků s velmi intenzivní chemoterapií, jejíž hlavní složkou je cytosin arabinosid a antracykliny. Indukční blok obsahuje kombinaci cytosinarabinosidu, lipozomálního arabinosidu a antracyklinů. Druhý indukční blok je tvořen kombinací mitoxantronu a cytosinarabinosidu, následující tři bloky obsahují vždy cytosinarabinosid, v kombinaci s idarubicinem, cladribinem a etoposidem [16].

Poté následuje fáze, která trvá 2–4 týdny a pro pacienta je velmi kritická z důsledku vyplívající dřevňové aplazie s hlubokou pancytopenií (počet trombocytů $< 20 \cdot 10^9/l$ a leukocytů $< 1 \cdot 10^9/l$), během které může dojít k úmrtí na infekční či krvácivé projevy [6]. Po této fázi indukční léčby se očekává regenerace fyziologické krvetvorby a po opětovném vyšetření kostní dřeně se zhodnocuje, zda došlo k jejímu obnovení (remise) nebo leukemické proliferace (parciální remise či recidivě nemoci) [6]. U pacientů, u nichž se onemocnění po indukci zhoršuje, je nezbytné rozhodnout o podání dalšího cyklu agresivní léčby, nebo paliativní či pouze symptomatické léčby [13].

2.6.2. Postremisní fáze kurativní léčby s transplantací krvetvorných buněk

Druhá fáze je fází postremisní, při níž je cílem zcela zredukovat zbytkovou leukemickou populaci a dosáhnout vyléčení nemocného. Tato fáze léčby má několik odlišných postupů a obecně je nazývána jako konsolidační léčba, při které je uplatňována intenzivní chemoterapie, případně vysokodávkovaná chemoterapie s alogenní transplantací kostní dřeně anebo krvetvorných kmenových buněk [6, 16].

Vysokodávkovaná chemoterapie s transplantací krvetvorných buněk je možná v případě dosažení kompletní remise, anebo v parciální remisi po indukční chemoterapii. U AML se většinou transplantuje v první remisi a nejčastěji je užívána alogenní transplantace krvetvorných buněk [6, 19].

Možnosti transplantace krvetvorných buněk

Transplantace krvetvorných buněk zahrnuje transplantaci kostní dřeně (BMT – Bone Marrow Transplantation), transplantaci kmenových (progenitorových) buněk z periferní krve (PBPC – Peripheral Blood Progenitor Cells) a transplantaci pupečnickové krve (CBT – Cord Blood Transplantation) [19].

Transplantace lze rozdělit podle dárce na syngenní, alogenní a autologní transplantace krvetvorných buněk. U syngenní transplantace krvetvorných buněk je dárce jednovaječné dvojče, přičemž výhodou je, že při transplantaci genetická identita nevyvolává odhojovací reakci. Při alogenní

transplantaci krvetvorných buněk může být dárce HLA (Human Leucocyte Antigen – lidský leukocytární antigen) kompatibilní sourozenec či rodič (tzv. příbuzenecká aleogenní transplantace) nebo HLA kompatibilní nepříbuzenecký dárce (tzv. nepříbuzenecká alogenní transplantace). Kompatibilní dárce je vyhledáván za pomoci českého anebo mezinárodního registru pro transplantace kostní dřeně. Poslední variantou je autologní transplantace krvetvorných buněk, u které jsou nemocnému v období remise odebrány, konzervovány a zmražením uschovány krvetvorné buňky. Dárce je tedy samotný pacient. Nevýhoda autologní transplantace spočívá v možném riziku kontaminace transplantátu (přítomnost leukemických buněk), neboť protinádorový účinek je pouze zaopátrán předtransplantační vysokodávkovanou chemoterapií. U alogenní transplantace dané riziko nehrozí, a navíc transplantát obsahuje lymfocyty, které jsou schopné identifikovat přežívající nádorové buňky příjemce [16].

U dětí, které podstoupily alogenní transplantaci kostní dřeně lze v posledních letech pozorovat značné snížení mortality a zlepšení léčebných výsledků v pediatrii spojené s transplantací. Z hlediska indikace jsou kritéria v pediatrii přesně specifikována [3].

Indikace k transplantaci krvetvorných buněk

K alogenní transplantaci krvetvorby (HSCT – hematopoietic stem cell transplantation) v první remisi jsou indikovány děti, které nedosáhnou kvalitní remise po druhém indukčním bloku chemoterapie, dále pacienti s nepříznivým karyotypem a v neposlední řadě při prodělání myelodysplastického syndromu nebo blíže nespecifikovanými poruchami krvetvorby [3, 6, 16].

Předtransplantační režim transplantace krvetvorných buněk

Jednotlivé druhy výše zmiňovaných transplantátů mají jednu společnou vlastnost, a to předtransplantační přípravu (přípravný režim), která zahrnuje vysokodávkovanou chemoterapii (samotná či kombinovaná s radioterapií), jejíž cílem je eliminovat zbytkovou nádorovou populaci v kostní dřeni, a zamezit tak dalšímu rozšíření relapsu nemoci [19].

Význam vysokodávkované chemoterapie spočívá v masivní imunosupresi, má výrazný protinádorový efekt a podílí se na „vytvoření“ místa pro přijetí nové kostní dřeně [19].

Předtransplantační režim je rozdělován na myeloblativní a nemyeloblativní. U myeloblativního předtransplantačního režimu je využívána vysokodávkovaná chemoterapie s/bez celotělové radioterapie s celkovou dávkou 10 až 15 Gy (0,05 Gy/min). Jako cytostatikum je nejčastěji používán cyklofosamid v dávce 60–120 mg/kg/den (dvoudenní aplikace) nebo jeho kombinace s busulfanem v dávce 16 mg/kg/den. Uvedený přípravný předtransplantační režim je význačný svým vysokým výskytem posttransplantační morbidity a mortality [19].

Nemyeloblativní předtransplantační režim se vyznačuje aplikováním středních dávek cytostatik a imunosuprese z čehož vyplývá, že je málo myelosupresivní, ale výrazně imunosupresivní. Nejužívanějšími cytostatiky jsou kombinace fludaribinu v dávce 30 mg/m²/den (šestitýdenní aplikace) s busulfanem v dávce 4 mg/kg/den (dvoudenní aplikace) a antitymocytním globulinem v dávce 20 mg/kg/den (čtyřdenní aplikace) [19].

Provedení transplantace krvetočivých buněk

Celkový proces transplantace krvetočivých buněk lze shrnout do tří fází. První fáze je přípravná, při níž je hledán vhodný HLA kompatibilní dárcce, a to v případě alogenní transplantace krvetočivých buněk. Nedílnou součástí zmíněné fáze je také proces přípravy příjemce k přijetí štěpu (transplantátu) účinným potlačením jeho imunologických mechanismů pomocí imunosupresivní léčby.

Při autologní transplantaci krvetočivých buněk je eliminována zbytková nádorová populace prostřednictvím cytostatické léčby, jež by mohla být zodpovědná za případný pozdější relaps onemocnění. Druhá fáze je z celého procesu transplantace nejméně náročná a spočívá v odběru a podání krvetočivých buněk. Odběr krvetočivých kmenových buněk z kostní dřeně od dárce se provádí tzv. punkcí do zadní části pánevních kostí v celkové anestezii. U alogenní a syngenní transplantace je dřeňový punktát ukládán do heparinizovaného kultivačního média a do 24 hodin dochází k nitrožilnímu převodu buněk. U autologní transplantace je punktát s dimethylsulfoxidem konzervován s tekutým dusíkem a před nitrožilním převodem je rozmražen v teplé lázni. V současné době převažuje odběr krvetočivých kmenových buněk z periferní krve a provádí se za pomoci krevních separátorů s nutností stimulace kostní dřeně růstovými faktory, které způsobují jejich vyplavení. Třetí fáze je vlivem projevů toxických účinků vysokodávkované chemoterapie fází nejrizikovější a nejnáročnější. Daná fáze je nazývána jako posttransplantační, u které mohou zmiňované toxické účinky vyvolat projevy pancytopenie (minimální odolnost vůči infekcím vzhledem k leukopenii, krvácivé projevy vzhledem k trombocytopenii a projevy anemického syndromu při anémii). Z důsledku zmíněných obtíží je zahájena intenzivní komplexní podpůrná léčba [19].

2.6.3. Podpůrná léčba

Celá léčba AML se neobejde bez masivní podpůrné terapie. Pacienti jsou při onkologické léčbě vystavováni celé řadě léčivých přípravků, které mají významnou hematologickou a nehematologickou toxicitu. Jedná se zejména o cytostatika, která jsou spjata s provedením transplantace krvetočivých buněk. Jednak jsou aplikovány jak v rámci přípravného předtransplantačního cytostatického režimu (busulfan, cyklofosamid, melfalan, fludarabin, cytosinarabinosid, etoposid), tak v posttransplantačním období. V posttransplantačním období jsou užívána v profylaxi reakce štěpu proti hostiteli (cyklosporin A, methotrexat, mykofenolát-mofetil, anti-thymocytární globulin a další). Naprostá většina těchto přípravků jsou registrována v ČR [16].

Z výše uvedeného plyne, že nezbytnou a důležitou roli v onkologické léčbě tvoří podpůrná léčba. Součástí podpůrné léčby je agresivní antimikrobiální léčba, jelikož pacienti s AML mají vysoce narušenou specifickou i nespecifickou imunitní obranu v období neutropenií a jsou extrémně citliví k infekčním komplikacím. U neutropeničtích nemocných je dbáno na zvýšený hygienický režim a speciální dietu. Potraviny jsou pacientům tepelně upravovány, aby obsahovaly minimální množství bakterií a plísní. V případě febrilní neutropenie je ihned zahájena empirická léčba antimykotiky z důvodu hrozby sepse a septického šoku [6, 13]. U pacientů s AML je do podpůrné léčby běžně řazena náhrada deficitu trombocytů a erytrocytů transfuzemi. Krevní produkty u alogenně transplantovaných pacientů se doporučují před aplikací ožářit. Podání deleukotizovaných krevních přípravků je doporučováno u nekomplikovaných nemocných, bez krvácivých projevů (při poklesu trombocytů na hodnoty $< 10 \cdot 10^9/l$) a u nemocných s chemoterapií či majících komplikace (při počtu trombocytů $< 20 \cdot 10^9/l$) [6, 13].

3. Busulfan

Busulfan je bifunkční alkylační protinádorový lék používaný v klinické praxi od počátku 60. let 20. století. Jedná se o látku s cytostatickým účinkem, která byla syntetizována na základě zjištění, že dichlordiethylsulfid (yperit) vede k atrofii lymfoidní tkáně a kostní dřeni. Na rozdíl od yperitu má selektivní depresivní účinek na kostní dřeň. V malých dávkách má malý vliv na lymfocyty, ale snižuje granulocytopoézu a v menší míře trombocytopoézu. Naopak větší dávky v závěru způsobují těžkou depresi kostní dřeni [20–22].

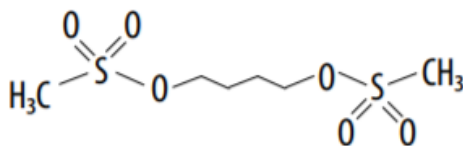
Od počátku sedmdesátých let je využívána vysoká dávka busulfanu jako náhrada celkového ozáření těla (TBI – Total Body Irradiation). Na podobné bázi jako u TBI funguje také busulfan, jehož účinky způsobují vyhlazení maligních nebo abnormálních buněk v kostní dřeni před infuzí zdravých hematopoetických buněk. V dnešní době se běžně používá v předtransplantačních režimech u pacientů, kteří podstupují transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT) [20, 23, 24].

3.1. Obecná charakteristika a fyzikálně-chemické vlastnosti

Busulfan je nespecifické antineoplastické činidlo alkylačního cyklu z buněk třídy alkylsulfonátů. Z chemického hlediska jde o diester kyseliny methansulfonové s dvojsytným alkoholem 1,4-dihydroxybutanem, tudíž o 1,4-butandiol dimethansulfonát (Obrázek 3.1). Jeho chemický abstraktní název tedy je 1,4-Butandiol, 1,4-dimethansulfonát a dle Mezinárodní unie pro čistotu a užitou chemii (IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry) je systematicky nazýván 4-Methylsulfonyloxybutyl methansulfonát [20–22].

V klinické praxi je označován synonymy jako 1,4-bis (methansulfonyloxy) butan; 1,4-butandiol dimethansulfonát; 1,4-butandiolu dimesylát; busulfan; Busilvex; Busulfex IV; 1,4-dimethansulfonyoxybutan; 1,4-dimethylsulfonyloxybutan; Myleran [22].

Busulfan je bílý, krystalický prášek, který není dobře rozpustný ve vodě. Z daného důvodu je potřeba ho nejdříve rozpustit v nepolárním prostředí (např. ve směsi dimethylacramidu a polyethylenglykolu nebo v dimethylsulfoxidu), a poté aplikovat ve vodném roztoku [22]. Jeho relativní molekulová hmotnost je 246,3 a jeho molekulový vzorec je: $C_6H_{14}O_6S_2$ [22].



Obrázek 3.1 Strukturní vzorec busulfanu [24]

3.2. Terapeutické indikace

Busulfan se využívá pro jeho protinádorové vlastnosti k dlouhodobé regulaci počtu leukocytů a v perorální formě je indikován k paliativní léčbě chronické fáze myeloidní leukémie (CML), a také k léčbě pacientů postihnutých polycytemií rubra vera, u kterých je účinný k navození dlouhodobé remise, a to zvláště v případech s výraznou trombocytózou. Busulfan je dále doporučován k léčbě

onemocnění myelofibrózou, primární trombocytemií a Non – Hodgkinova lymfomu. Perorálně se běžně používá jako součást léčebného režimu pro přípravu pacientů na transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT) v kombinaci s cyklofosfamidem nebo i fludarabinem jako varianta k režimům zahrnující TBI. Perorální forma léku je však spojena s mnohočetnými komplikacemi (Kapitola 3.5.2) a ze zmíněných důvodů byla vyvinuta intravenózní forma busulfanu [21, 22, 24, 30, 31].

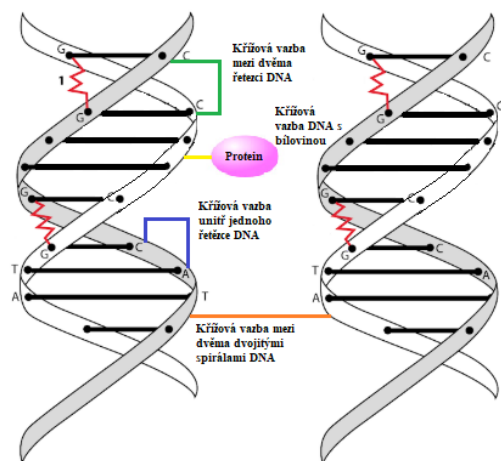
V současné době je intravenózní busulfan indikován k použití v kombinaci s jinými medikamenty k přípravné léčbě před transplantací krevetvorných hematopoetických buněk. U dospělých pacientů se používá ve spojení s cyklofosfamidem (BuCy2), zatímco u pediatrických pacientů (ve věku 0–17 let) může být použit ve spojení s melfalanem (BuMel), anebo s cyklofosfamidem. Tyto přípravné režimy před alogenní či autologní transplantací kmenových buněk se využívají k léčbě velkého počtu maligních onemocnění, jako je leukémie a některých genetických onemocnění, jako jsou syndromy imunitní nedostatečnosti [31].

3.3. Farmakodynamické vlastnosti

Busulfan je řazen do kategorie genotoxických cytostatik a látek s alkylačním účinkem. Jeho genotoxický účinek je dán bloádou replikace DNA, která vzniká v důsledku strukturálního poškození DNA vyvolané cytostatikem. Jde o přímé strukturální poškození zcela hotových nukleonových kyselin. K poškození nukleonových kyselin dochází vlivem alkylací busulfanu [28].

3.3.1. Mechanismus účinku léku

Busulfan je bifunkční alkylační činidlo, ve kterém jsou dvě nestabilní methansulfátové skupiny připojeny k protilehlým koncům 4-uhlíkového alkylu. Ve vodných roztocích busulfan hydrolyzuje, a tím dojde k uvolnění methansulfátových skupin, které produkují radikály – karboniové ionty. Reaktivní ionty karbonia mohou alkylovat DNA a jiné proteiny, které vedou k cytotoxicitě. Mechanismem působení prostřednictvím alkylace vznikají pevné kovalentní vazby mezi alkylačním činidlem a bázemi DNA cytosinem, adeninem nebo nejčastěji guaninem. Vytvořením této vazby je DNA znehodnocena (denaturována) a může mít za následek vznik mutací, při kterých není schopná separace řetězců DNA při replikaci. Většina alkylačních cytostatik má alespoň dvě alkylační skupiny. Výsledkem alkylační reakce pak může být patologické propojení bází (Obrázek 3.2) uvnitř jednoho řetězce DNA (intra–strand DNA cross–link), mezi dvěma řetězci (inter–strand DNA cross–link), mezi dvěma dvojíty spirálami (inter–helical DNA cross – link), popřípadě spojení DNA s bílkovinami (DNA protein cross–link). Alkylace bází může vést k rozštěpení obou řetězců DNA (dvojité zlom DNA) nebo k zástavě replikační vidlice. Tímto způsobem dochází k chybnému párování – vzniku mutací. Buňku s poškozenou DNA mohou opravovat reparační enzymy jimiž sama disponuje. Dokáží z řetězce vystříhnout nukleotidy s alkylovanou bází a nahradit je normálními nukleotidy. Zvýšená aktivita reparačních enzymů může způsobit značné snížení až ztrátu schopnosti buňky reagovat na genotoxický stres apoptózou. Výsledkem daného defektu bývá rezistence nádorových buněk vůči alkylačním cytostatikům. Možnost reparace je zhoršená dojde-li k propojení bází, a to uvnitř řetězce. Dojde-li k propojení dvou nukleotidových řetězců dvojité spirály DNA, nemohou se při replikaci řetězce DNA oddělit, takže se zastaví buněčné dělení a buňka prochází apoptózou [20, 25, 28, 29].



Obrázek 3.2 Znázornění alkylačního účinku cytostatik a propletení křížových vazeb DNA [28]

Protinádorový účinek busulfanu je specifický tím, že nereaguje jen na určité fáze buněčného cyklu, ale reaguje i na buňky klidové, a to v G0 fázi buněčného cyklu. Ničí tak pluripotentní hemopoetické buňky, které jsou z 90 % v klidové fázi, což odůvodňuje jeho hematologickou toxicitu [21].

3.4. Dávkování

Busulfan je možné podávat v perorální nebo nověji v intravenózní formě (forma IV busulfanu). Intravenózní forma byla vyvinuta na základě klinické praxe s perorální formou busulfanu s kterou byly spjaté problémy týkající se zajištění dávky, správné myeloablace, zvracení a nežádoucích účinků [23].

Perorální forma busulfanu

Busulfan je dostupný jako tableta obsahující 2 mg busulfanu určená pro perorální podání. U dospělých pacientů postihnutých chronickou myeloidní leukémií činí obvyklá perorální dávka pro dosažení remise 4–8 mg (celodenní dávka). Dávkování probíhá na základě hmotnosti daného pacienta a je stejné jak u pediatrických či dospělých pacientů. Počáteční dávky se pohybují přibližně okolo 0,06 mg/kg tělesné hmotnosti nebo 1,8 mg/m² tělesného povrchu denně. V léčbě se pokračuje do chvíle, dokud počet bílých krvinek neklesne na 15 000 až 25 000 buněk/mm³ (typicky 12–20 týdnů). Napříč tomu, pokud počet krevních destiček klesne pod 100 000 buněk/mm³, musí být léčba přerušena z důvodu rizika ireverzibilního poškození kostní dřeně čili aplazie. Pouze za okolností nedostatečné odpovědi lze po třech týdnech léčby denní dávku zvýšit [22, 31].

Při léčbě pacientů s polycytemií vera činí perorální dávka 4–6 mg busulfanu denně, která se podává po dobu 4–6 týdnů, u níž jsou pečlivě sledovány krevní elementy zejména trombocyty. Další cykly jsou opakovány v případě relapsu nemoci. V případě stanovení udržovací léčby jsou podávány pouze poloviční počáteční dávky. U léčby trombocytémie nebo myelofibrózy jsou podávány 2–4 mg denní dávky busulfanu [22, 31].

V přípravném režimu pro transplantaci krvetvorných kmenových buněk (HSCT) u dospělých pacientů i dětí je busulfan podáván v perorálních dávkách okolo 4 mg/kg (celková denní dávka). Dávkování se zahajuje sedm dní před transplantací, přičemž léčba trvá čtyři dny během, kterých je každých šest hodin podávána dávka okolo 1 mg/kg busulfanu (celková dávka 16 mg/kg). Po 24 hodinách od užití poslední dávky busulfanu se zahajuje léčba s cyklofosfamidem. Ten se podává v dávce 60 mg/kg/den

a léčba trvá obvykle dva dny. Například pacient, který váží 24 kg musí užít dvanáct 2 mg tablet na dávku, což odpovídá 48 tabletám denně nebo 192 tabletám za čtyři dny. V důsledku vysokého počtu užití tablet jsou tablety pacientům přidávány do měkkých potravin, anebo jsou rozemleté pro snadnější požití. V případě zvracení je velký problémem zjistit, kolik tablet zůstalo a kolik jich bylo vyzvraceno. Další úskalí spojené s perorálním podáním busulfanu, vyplývá z proměnné a nepravidelné absorpce do gastrointestinálního traktu. Z uvedených důvodů byla vyvinuta intravenózní forma busulfanu a ve většině center se nyní užívá jako součást přípravných léčebných režimů k HSCT [22, 23].

Intravenózní forma busulfanu

Busulfan je dostupný jako injekční koncentrát pro intravenózní infuzi obsahující 6 mg/ml (60 mg) busulfanu pro parenterální podání. Intravenózní (IV) přípravek je určen k léčbě před transplantací hematopoetických kmenových buněk, přičemž dávkování může probíhat v kombinaci s cyklofosfamidem, melfalanem či fludarabinem. Režimy obsahující intravenózní (IV) formu busulfanu se používají zejména u kojenců a malých dětí z důvodu možného vyloučení potřeby sedace, anestezie při každé dávce, a aby se zamezil nebo snížil pozdní výskyt nežádoucích účinků spojených s TBI [22, 23, 32].

V případě dávkování v kombinaci s cyklofosfamidem nebo melfalanem se busulfan podává intravenózně v závislosti na tělesné hmotnosti (Tabulka 3.1) v doporučené dávce 0,8 mg/kg u dospělých pacientů a 0,8–1,2 mg/kg dětí (0 až 17 let). Podává se ve dvouhodinových infuzích každých šest hodin po dobu čtyřech dnů (celkem 16 dávek). Po šestnácté dávce busulfanu a 24hodinovém intervalu, následuje podání cyklofosfamidu v dávce 60 mg/kg denně po dobu dvou dnů u dospělých pacientů. U pediatrických pacientů se podává cyklofosfamid ve čtyřech cyklech v dávce 50 mg/kg tělesné hmotnosti, nebo jednorázovým podáním melfalanu v dávce 140 mg/m² s 24hodinovým rozestupem po 16. dávce léku busulfanem [22, 30, 32].

Tabulka 3.1 Doporučená dávka přípravku busulfanu [32]

Skutečná tělesná hmotnost [kg]	Dávka přípravku busulfan [mg/kg]
< 9	1,0
9 až < 16	1,2
16–23	1,1
> 23–34	0,95
> 34	0,8

U obézních nebo těžce obézních pacientů by měl být IV busulfan podáván na základě upravené ideální tělesné hmotnosti [23]. Dávkování busulfanu v režimu s fludarabinem je pro pediatrické i dospělé pacienty stejné. Fludarabin je podáván v hodinové infuzi v jednotlivé denní dávce 30 mg/m² po dobu pěti dnů nebo 40 mg/m² po dobu čtyřech dnů. Po podání fludarabinu následují tříhodinové infuze busulfanu jednotlivých denních dávek 3,2 mg/kg po dobu 2 až 3 dnů [32].

Busulfan musí být před aplikováním naředěn 0,9% chloridem sodným (normální fyziologický roztok) nebo 5% roztokem dextrózy ve vodě (D5W), přičemž výsledná koncentrace se musí pohybovat okolo 0,5 mg/ml busulfanu. Intravenózní infuze přípravku nesmí být aplikována rychlou intravenózní injekcí (v bolusu) nebo periferní injekcí, ale musí být aplikována za pomoci centrálního žilního katetru.

Všichni pacienti musí být premedikováni antikonvulzivními přípravky, aby se předešlo konvulzivním stavům (epileptické záchvaty s křečemi) způsobeným vysokými dávkami busulfanu [23, 32].

3.5. Farmakokinetické vlastnosti

Na základě klinicky významných farmakokinetických parametrů (PK) (Tabulka 3.2) byl hodnocen plazmatický farmakokinetický profil dávky busulfanu, pro stanovení optimálního terapeutického okna u dospělých a dětí. Stanovení terapeutického okna a zároveň optimální dávky při dosavadní léčbě busulfanem, obzvláště u dětí podstupující HSCT, vyžaduje zvláštní pozornost vůči rozdílům v metabolismu léku, clearance (míra schopnosti těla eliminovat drogu) v závislosti na hmotnosti a věku, a biologické dostupnosti (podíl podané látky objevené v systémové cirkulaci). Optimální dávka předchází možnosti předávkování nebo podhodnocování, což vede k účinné přilnavosti a zároveň snižuje toxicitu orgánů a nežádoucí účinky způsobené dávkami léku. Z daného důvodu je zásadní podstatou porozumění terapeutického okna a farmakokinetické variability, která vyžaduje úpravu dávky na základě výpočtů plochy pod křivkou (AUC – Area under the curve) [23–27].

AUC zobrazuje plazmatické koncentrace busulfanu vyjádřené v ng/hod.ml, nebo průměrné plazmatické koncentrace léčiva v plazmě (C_{ss}) v rovnovážném stavu, vyjádřené v ng/ml. Charakterizuje tak systémovou expozici (vystavení organismu faktorům ovlivňujícím zdraví člověka) léčiva stejně jako různá měření koncentrace v plazmě (tj. maximální, minimální, průměr). Hodnota AUC u perorálního busulfanu představuje přibližně 1,5násobek C_{ss} u pediatrických pacientů. Podle klinických studií a farmakokinetických analýz u pacientů různé věkové kategorie k HSCT bylo zjištěno klinicky přijatelné terapeutické okno pro busulfan. Terapeutické okno bylo stanoveno v rozmezí 3240–6075 ng/hod/ml, přičemž některá centra preferují větší vymezení okna a to na 3645–5468 ng/hod/ml [23].

Busulfan má úzký terapeutický index, proto u pacientů jejichž koncentrace v krvi klesají pod dolní hranici terapeutického okna (tj. nízké hodnoty AUC nebo C_{ss}), mohou zvýšit riziko recidivy onemocnění a selhání štěpu. Zatímco pacienti s krevními koncentracemi nad horní hranicí (tj. vysoká hodnota AUC nebo C_{ss}) jsou vystaveni zvýšenému riziku toxicity, záchvatům a hepaticky veno-okluznímu onemocnění (HVD), které postihuje přibližně 20–30 % pacientů při HSCT. Stejně jako nesprávně nízké hladiny busulfanu jsou i vysoké systémové expozice léku spjaté s onemocněním štěpu proti hostiteli [20, 23, 24, 27, 34].

U pediatrických pacientů s maligním onemocněním bylo zjištěno, že rozsah optimální expozice busulfanem nebo terapeutické okno po perorálním podání 0,8–1,0 mg/kg každých šest hodin byl AUC 3240–6075 ng/hod/ml. Odpovídající rozmezí C_{ss} je 2430–3645 ng/ml. Dávka erorálního busulfanu by měla být upravena tak, aby bylo u pediatrických pacientů dosaženo terapeutické AUC v plazmě 3240–6075 ng/hod/ml [23].

Tabulka 3.2 Klinicky významné PK [36]

Zkratka	Pojem	Význam
CV	Variační koeficient [%]	Vyjadřuje variabilitu PK u stejného nemocného nebo mezi různými nemocnými
AUC	Plocha pod křivkou [ng/hod/ml]	Plocha vyjadřuje koncentrace látky v jednotlivých časových úsecích po podání
C_{max}	Maximální koncentrace	–
C0	Koncentrace před podáním další dávky	–
C2	Koncentrace za 2 hodiny podání	–
F	Biologická dostupnost [%]	Podíl léčiva, který dosáhl systémové cirkulace
T1/2	Čas do dosažení poloviny maximální koncentrace [hod., min]	–
Tmax	Čas do dosažení maximální koncentrace	–
Vd	Distribuční objem [l/kg]	Fiktivní veličina, prostor, do kterého se lék po podání rozpptýlí v určité zjištěné koncentraci
Clearance	Clearance [ml/min]	Objem plazmy, který se za časovou jednotku očistil od účinné látky

3.5.1. Absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování

Busulfan se po perorálním podání snadno absorbuje z gastrointestinálního traktu, rychle se váže na červené krvinky a plazmatické bílkoviny (např. albumin) a rychle se uvolňuje z krve. V případě podání intravenózní cestou se více než 90 % vyloučí z plazmy již po tšech minutách. V játrech se léčivo značně metabolizuje na inaktivní sloučeniny (méně aktivní metabolity obsahující síru), které se vylučují ledvinami. Hlavním metabolitem je kyselina methansulfonová, ačkoli existuje více než 10 dalších, zcela nezjištěných metabolitů. Navzdory rychlému uvolnění z krve a jejímu rozsáhlému metabolismu se značený busulfan vylučuje poměrně pomalu, přičemž 25–60 % radioaktivity se vylučuje, především jako metabolity, do 48 hodin po podání. Biologický poločas busulfanu se pohybuje okolo 2–3 hodin [22, 35].

3.5.2. Variabilita v busulfanové farmakokinetice

Perorální busulfan

Biologická dostupnost při režimu perorálního podání busulfanu vykazuje značnou interindividuální variabilitu (v průměru 80 %) v plazmatických hladinách, vlivem zvracení a nepředvídatelné a nepravidelné gastrointestinální absorpci. Jeho koncentrace v plazmě se mezi dávkami mění, což ovlivňuje bezpečnost, efektivitu a výsledky HSCT. Značně se liší také clearance v rozmezí od 0,8 do 20 ml/min/kg. Obzvláště mezi pediatrickými pacienty vytváří perorální biologická dostupnost busulfanu vysokou variabilitu. Variabilita ve farmakokinetice může být u dospělých a dětí ovlivněna věkem, hmotností, metabolismem léčiva, jaterní funkcí, komorbiditou a souběžným podáváním léků. Zejména u malých dětí bylo zjištěno, že také cirkadiánní rytmy mohou ovlivnit systémovou expozici léčiva. Noční koncentrace busulfanu byla u některých malých dětí trojnásobně vyšší než během dne.

Na základě pozorování byla celková tělesná clearance podstatně vyšší u malých dětí (7,3 ml/min/kg) v porovnání se staršími dětmi a dospělými (3,02 a 2,7 ml/min/kg). Podle studií brání užití perorálního busulfanu nepravidelné absorpci, což vede k nespolehlivým plazmatickým hladinám [23, 25, 33, 34].

Intravenózní busulfan

Ve srovnání s perorálním podáním vstupuje intravenózní (IV) forma busulfanu vstupuje do systémové cirkulace okamžitě po podání, a proto je jeho farmakokinetická variabilita mnohem nižší. Tato snižující se inter (CV = 21 %) a intraindividuální (CV = 12 %) variabilita pacientů týkající se koncentrace busulfanu v krvi byla prokázána pomocí farmakokinetické analýzy populace, provedené na 102 pacientech. Rozdíly mezi variabilitou perorálního busulfanu a IV busulfanu jsou stále zkoumány, zvláště u pediatrické populace kvůli probíhajícímu vývoji orgánů a diferenciačnímu zrání enzymů metabolizujících léky. Farmakokinetická analýza ukázala, že na základě dávky busulfanu v dávce 0,8 mg/kg dosáhlo 17 z 24 dospělých pacientů cílových koncentrací AUC plazmatického busulfanu 3645–5468 ng/hod.ml (+ 5 %). Zbývajícím sedmi pacientům musela být dávka upravena tak, že dvěma subjektům se dávka snížila a pěti zvýšila. Farmakokinetika v dávkách 3645 a 5468 ng/hod.ml ukázala, že 21 z 23 pacientů s dostupnými daty mělo hodnoty AUC v ustáleném stavu, které se dostaly do cílového rozmezí. Závěry potvrzují, že farmakokinetika dávky 0,8 mg/kg u dětí stejně jako u dospělých, přesně předpovídá AUC dávky 3645 a AUC 5468 ng/hod.ml s úpravou dávky nebo bez ní, a že AUC zůstává v terapeutickém okně. Dané zjištění poskytuje zabezpečení dávky pro klinickou účinnost a bezpečnost dávky IV busulfanu schválené Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA – Food and Drug Administration) s Terapeutickým monitorováním léků (TDM – Therapeutic Drug Monitoring). V porovnání s dospělými pacienty jsou systémové expozice intravenózního busulfanu u dětských pacientů poměrně nízké, avšak další studie by mohly vést k jejich zvýšení [20, 23–25, 33, 34].

3.6. Stanovení

Terapeutické monitorování hladin léčiva

Terapeutické monitorování léčiv (TDM – Therapeutic Drug Monitoring) je metoda pro monitorování terapie, která je založena na principu optimálního terapeutického okna pro dané léčivo, pomocí měření koncentrace cirkulujícího léku v biologickém materiálu (séru, krvi, plazmě), přičemž následuje následná úprava dávky pro dosažení předem stanovené cílové expozice léčiva. Jejím základním předpokladem je existence úzkého vztahu mezi koncentrací léčiva v biologickém materiálu a jeho farmakologickým efektem. TDM je využíváno u různých skupin léčiv. Využití TDM v oblasti cytostatik nese mnoho úskalí z důvodu lineární souvislosti mezi koncentrací v biologických tekutinách a efektem na leukemické buňky nebo s koncentrací v místě účinku, které nejsou zdaleka zřejmé. Farmakokinetické hodnocení a podrobnější sledování hladin má své opodstatnění, zejména při podávání vysoké dávky chemoterapie [23, 37].

Busulfan je lék s úzkým terapeutickým rozmezím, u kterého se projevuje významná interindividuální variabilita farmakokinetiky, proto je nutné jeho koncentrace monitorovat. Predikce AUC plazmatické koncentrace busulfanu se ukázala jako přínosná hlavně z hlediska předcházení nežádoucím účinkům. Variabilita absorpce a systémové expozice může vést k podhodnocení či předávkování. Stanovení cíleného dávkování je přínosné pro dosažení a udržení optimálních koncentrací busulfanu v krvi nebo plazmě pro dosažení účinné myeloablace před HSCT. Na přesné stanovení koncentrací léčiv v plazmě je rozhodující časový úsek odběru vzorků. TDM se především doporučuje pro perorální formu busulfanu, avšak 25 % pacientů nemůže být hodnoceno pro farmakokinetiku. Účelem TDM je sledovat a kontrolovat farmakokinetickou variabilitu a pomáhat při úpravě dávky, která může zajistit konzistenci dávkování, minimální toxicitu a maximální účinnost. Nejspolehlivější výsledky se dosahují u léčiv, které mají lineární farmakokinetický profil a dosahují předvídatelných koncentrací v krvi. Farmakokinetické studie IV busulfanu ukazují, že denní dávky poskytují předvídatelnou lineární kinetiku s menší variabilitou než perorální dávkování. V současné době téměř většina ústavů využívá AUC získané ze sériového monitorování koncentrací po podání k posuzování charakteristik PK u pediatrických i dospělých pacientů podstupujících HSCT. Pro správný a rychlý výpočet AUC je důležité včasné a přesné stanovení koncentrace busulfanu v plazmě [20, 23, 24, 27].

Farmakokinetické odběry vzorků a hodnocení

Odběr farmakokinetického vzorku se provádí za účelem stanovení plazmatických koncentrací busulfanu. Měřené parametry zahrnují clearance a maximální koncentraci (C_{max}), které poskytují přesné měření AUC v průběhu času. Odběr vzorku se provádí ihned po dokončení dvouhodinové infuze, přičemž je velmi důležité přesné načasování odběru vzorku, tj. přesný čas zahájení infuze a zastavení. Po dokončení infuze se odebere krev, která se umístí na led a odešle do laboratoře k analýze. U pediatrických pacientů se doporučuje využívat validované strategie omezeného odběru vzorků pro farmakokinetický vzorek s IV busulfanem, kvůli zajištění přesného dávkování. Po podání perorální formy busulfanu je volena konvenční strategie odběru vzorků pro stanovení AUC nebo C_{ss} , která závisí na počtu vzorků odebraných po několika podaných dávkách. Omezená strategie odběru vzorků pro IV busulfan u dětí spočívá celkem v odběru osmi vzorků v časech 0 (bezprostředně před), 2, 4 a 6 hodin v době po zahájení infuze páté dávky (kondicionační režim busulfanem každých 6 hodin pro 16 dávek) a 0 (bezprostředně před), 2, 4 a 6 hodin po zahájení deváté dávky. Respektive dvě hodiny jsou okamžitě po infuzi a šest hodin po zahájení infuze, což umožňuje včasné úpravy dávky a přesné dávkování [20, 23].

3.7. Nežádoucí účinky

Mezi nežádoucí účinky patří deprese kostní dřeně, zejména trombocytopenie, která se z klinického hlediska projevuje horečkou, bolestmi v krku, lokální hemoragií či anémií. V konečném důsledku může vyústit v pancytopenii, projevující se poklesem všech typů krevních buněk. Z uvedeného důvodu je nutné pravidelně kontrolovat krevní obraz, zvláště počet leukocytů [21].

Další nežádoucí účinky jsou spojeny s výskytem difúzní intersticiální plicní fibrózy včetně progresivní dyspnoe, horečky, šelestů a dlouho se vyskytujícím neproduktivním kašlem. Zásadní komplikací daného poškození je postižení superinfekcí anebo kalcifikací. V případě projevu plicní toxicity je i přes okamžité ukončení léčby busulfanem prognóza špatná [21].

Výskyt hyperpigmentace 5–10 % byl zaznamenán zejména u pacientů s tmavou pletí a zasaženy byly oblasti krku, loktů, kolen, bradavek, břicha a dlaní. Hyperpigmentace se v některých případech vyskytla jako součást klinického syndromu podobného Addisonově chorobě, přičemž v některých případech po vysazení léčby příznaky vymizely [21].

Při podávání běžných dávek busulfanu se hepatotoxické účinky projevily jako bezvýznamné. V ojedinělých případech došlo k abnormální funkci jater nebo se projevila cholestatická žloutenka. Během podávání vysokých dávek busulfanu, byla zaznamenána hyperbilirubinémie, žloutenka, hepatální venookluzivní onemocnění a cetrilobulární sinusoidní fibróza s hepatocelulární atrofii a nekrózou [21].

Ve vzácných případech došlo ke změnám oční čočky či vzniku katarakty a bylo také popsáno ztenčení oční rohovky [21].

Sporadicky mělo podávání obvyklých dávek busulfanu vliv na gastrointestinální trakt projevující se nauzeou, zvracením, průjmem, slabostí, úbytkem hmotnosti až anorexií. Zmíněným komplikacím je možné se vyhnout podáváním dělených dávek [21].

Podávání vysokých dávek busulfanu dospělým pacientům se projevilo také křečemi, které byly pozorovány zejména u pacientů s předešlými projevy či úrazy hlavy [21].

Na počátku chemoterapie může docházet k rychlé destrukci granulocytů způsobující hyperurikémii, jež může dát za vznik nefropatii. Hrozbu nefropatie lze minimalizovat zvýšenou hydratací, alkalizací moči u hospitalizovaných pacientů a profylaktickým podáním alopurinolu nebo jiných inhibitorů xanthinoxidázy [21].

4. Chromatografické metody pro stanovení busulfanu – kapalinová chromatografie

Chromatografie patří do rozsáhlé skupiny analytických separačních (dělicích) metod. Tyto metody umožňují získávat čisté látky pomocí separace látek nebo slouží ke správnému a přesnému stanovení obsahu složky ve vzorku i v přítomnosti směsi jiných látek [40, 41].

V současné době se jedná o jednu z nejpoužívanějších technik v mnoha odvětvích lidské činnosti. V oborech laboratorní diagnostiky jsou zcela nenahraditelné pro analýzu látek v oblasti TDM léků, toxikologie a dědičných metabolických poruch [38].

Konkrétně pro TDM busulfanu v plazmě a v jiných biologických tekutinách se využívá chromatografických technik v kombinaci s několika detekčními metodami. Mezi stávající metody patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) spojená s UV detekcí nebo fluorescenčními detekcí a kapalinová chromatografie (LC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC – MS/MS). Metody HPLC jsou přesné a citlivé a umožňují i stanovení metabolitů, ale jsou velmi pracné a časově náročné na přípravu vzorku. Také čas analýzy během HPLC testu je značně zdoluhavý. Naopak metody LC-MS/MS jsou specifické svou vysokou citlivostí, kratší přípravou vzorku a kratším časem analýzy, čímž je sledování busulfanu rychlejší a snazší v klinické praxi, a v porovnání s HPLC vyžadují malý objem vzorku, což je přínosné pro pediatrickou populaci [24, 42].

4.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) je jednou z metod vysokotlaké kolonové chromatografie, která slouží k separaci (oddělení) sledovaného analytu (analytů) od dalších látek ve vzorku na základě jejich molekulární struktury a molekulárního složení, a následné detekci za pomoci vhodně zvolené detekční techniky, při níž se stanovuje koncentrace látky ve směsi (kvantitativní analýza) anebo se látka ve směsi identifikuje (kvalitativní analýza) [38, 40].

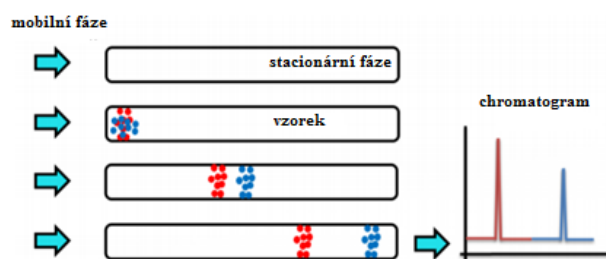
Podstata HPLC spočívá v separaci analytů, při níž složky směsi interagují se dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi – pohyblivou neboli mobilní fází = eluent (MF) a nepohyblivou neboli stacionární fází = sorbent (SF). Mobilní fází je kapalina (nejčastěji směs rozpouštědel) a její zvolení závisí na použité stacionární fází. Stacionární fází bývá tuhá látka nebo kapalina zakotvená na tuhém nosiči (křemenné kuličky o průměru řádově v mikrometrech), který je umístěn v chromatografické koloně. Po aplikaci do systému se vzorek pohybuje s mobilní fází. Proces je založen na rozdílné síle interakce dělených složek s mobilní a stacionární fází. Složky, které se stacionární fází interagují silněji se kolonou pohybují nižší rychlostí (mají vyšší retenci), než složky, které vykazují slabší interakci. Látka, která má delší retenční čas a dosahuje tak větší retence, vyústí z kolony později [38, 39, 40]. Separace dvousložkové směsi v chromatografickém systému je znázorněna na (viz Obrázek 4.1).

Rychlost pochybu složek směsi (analytů) kolonou je závislá na mnoha faktorech, mezi které patří:

- rozdílná afinita (schopnost se vázat) analytů ke stacionární fází

- různá distribuce (rozdělení) jednotlivých analytů mezi mobilní a stacionární fázi
- analyty jsou rozdílně zpoždovány (retardace) a zadržovány (retence)

Výstupem této metody je chromatogram – grafické znázornění závislosti intenzity signálu na čase, v němž se hodnotí retenční čas, který v daném systému při definovaných podmínkách slouží k identifikaci analytu, a plocha/výška píku (eluční křivka), která je funkcí koncentrace stanovované látky [38, 40].

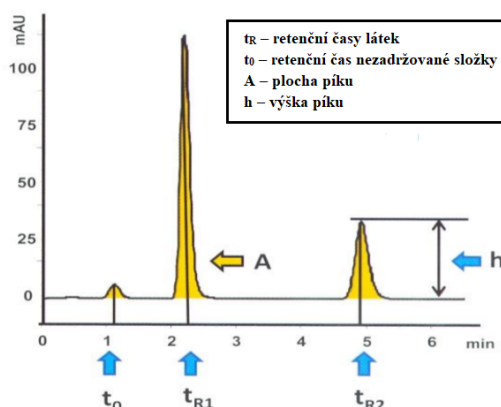


Obrázek 4.1 Separace dvousložkové směsi v chromatografickém systému [40]

O průběhu separace rozhodují vzájemné interakce stacionární fáze se separovanými látkami a také typ použité mobilní fáze. Na základě těchto interakcí je možné rozlišit následující separační mechanismy: adsorpční (interakce kapalina – pevná látka), rozdělovací (interakce kapalina – kapalina), iontové výměnné (na základě rozdílné síly interakce nabitých částic k opačně nabitým funkčním skupinám stacionární fáze), afinitní (interakce protilátka – antigen), gelová (na základě principu omezeného transportu látek materiálem s přesně definovanými póry). Výsledná separace bývá často kombinací několika výše uvedených mechanismů [38].

4.1.1. Eluční parametry

Charakteristickou veličinou pro každou dělenou látku v chromatografickém systému je retenční (eluční) čas t_r nebo retenční objem V_r . Retenční čas udává dobu, při níž byl analyt zadržován v separační koloně od nástřiku vzorku po maximum vrcholu píku. Retenční objem představuje pak objem mobilní fáze, která za tuto dobu proteče kolonou (Obrázek 4.2) [40].



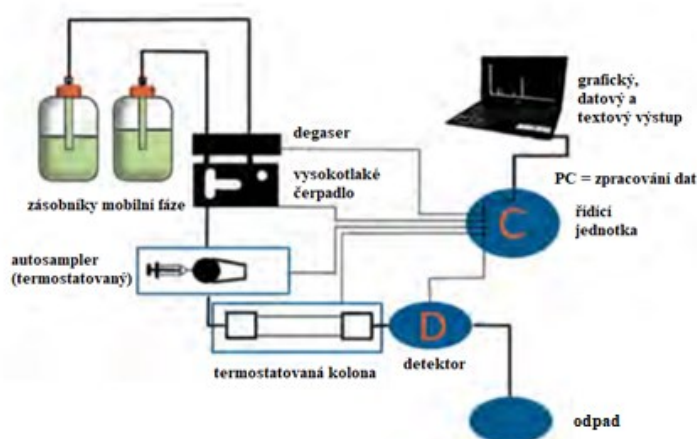
Obrázek 4.2 Kvalitativní a kvantitativní charakteristiky chromatografického procesu [40]

Grafickým znázorněním závislosti intenzity odezvy detektoru na čase je chromatogram, ve kterém základní linie rovnoběžná s osou x znamená průchod čisté mobilní fáze a průchod eluované látky se projeví nárůstem a následně poklesem signálu, tedy píkem [40].

Plocha vymezená píkem nad základní linií, plocha píku, je úměrná množství látky v zóně a je tedy parametrem kvantitativní analýzy. Někdy bývá místo plochy píku jako údaj pro kvantitativní analýzu uváděna výška píku, a to zejména pokud jsou píky ostré a úzké a není k dispozici výpočet plochy počítačem [40].

4.1.2. Komponenty HPLC

Metoda HPLC se provádí na kapalinovém chromatografu, který se skládá ze zásobníku mobilní fáze, degaseru (odplyňovače), vysokotlaké pumpy (čerpádky), autosampleru (dávkovacího kohoutu), separační kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Tyto komponenty zajišťují transport MF, dávkování vzorku, následnou separaci látek a jejich detekci. V následujících odstavcích budou jednotlivé funkční jednotky kapalinového chromatografu rozepsány podrobněji. Typická HPLC sestava je znázorněna schematicky (viz Obrázek 4.3) [38].



Obrázek 4.3 Základní instrumentální schéma HPLC [38]

Mobilní fázi mohou tvořit až 4 roztoky, které jsou v degaseru odplyněny, následně smíchány a čerpány vysokotlakou pumpou. V tomto procesu jsou využívána izokratická eluce, které je docíleno konstantním složením mobilní fáze v průběhu měření, nebo gradientová eluce, jejímž cílem je zvýšení eluční síly, které je dosaženo změnou složení mobilní fáze během separace. Izokratická eluce dovoluje využití širšího spektra detektorů, zajišťuje stabilní základní linii chromatogramu. Avšak gradientová eluce je výhodnější v případech, kdy požadujeme, aby došlo k separaci stanovovaných analytů, umožňuje získat užší a ostřejší píky v chromatogramu, čímž je zajištěna vyšší citlivost měření [38].

V nástřikovém zařízení neboli autosampleru, kterým dále mobilní fáze prochází, dochází za pomoci smyčky o určitém objemu (obvykle 10–100 μ l) a vícecestného ventilu k vnášení vzorku do toku mobilní fáze [38].

Vlastní separační proces následně probíhá na termostatované koloně, která bývá opatřena předkolonou či filtrem. Na základě typu separovaných sloučenin se vybírá uspořádání HPLC metody, které bývá buď „normální“ (NP) nebo „reverzní“ čili obrácené (RP). První zmíněné uspořádání má polaritu

mobilní fáze menší než polaritu fáze stacionární, kterou bývá oxid křemičitý, přičemž mobilní fáze je tvořena nepolárním rozpouštědlem (např. hexan či heptan). Tento způsob separace na normální fázi se využívá pouze zřídka, jelikož separuje polární látky, které představují v biomedicínských oborech jen úzkou část analytů. Druhý případ uspořádání „HPLC na reverzní fázi“, je používán daleko častěji, a to z důvodu separace méně polárních a nepolárních látek, mezi které patří většina bioanalytů včetně léčiv či drog. Tato metoda se vyznačuje vysokou variabilitou. Pomocí silikagelu nebo jiného pevného materiálu je stacionární fáze navázána na povrchu nosiče. Film, jež je tvořený nepolárními alifatickými skupinami např. oktadecylovým uhlíkovým řetězcem (-C18) plní funkci stacionární fáze, která je umístěna v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Mobilní fáze představují směsi vody nebo pufru s obsahem polárních organických rozpouštědel, jako je metanol nebo acetonitril, která protéká tímto sorbentem, tzv. chromatografickým ložem. V průběhu HPLC na reverzní fázi se jako první vymývají (eluují) látky vysoce polárního charakteru. S klesající polaritou látek se začínají uplatňovat jejich interakce se stacionární fází, což je obvykle spojeno s přibývajícím retencí těchto látek v koloně. Chromatografická kolona musí odolávat chemickému působení mobilní fáze a vysokým tlakům (řádově až desítky MPa) způsobenými velkými průtoky mobilní fáze přes velmi malé částice stacionární fáze. Velikost kolony se pohybuje v délkách 5 až 25 cm, vnitřním průměr 1 až 4,6 mm, velikost částic náplně 1 až 10 μm . Velikost částic o rozměru 10 μm se používá velmi zřídka [38, 40]. Poté, co mobilní fáze se separovanými analyty projde kolonou, míří do detektoru. Nejvíce jsou využívány detektory absorpční fotometrické (měřící prošlé světlo – UV/VIS), dále pak fluorescenční (měřící sekundární záření po absorpci primárního elektromagnetického záření), elektrochemické (měřící vzniklý proud při průchodu oxidované či redukované formy látky), nebo refraktometrické detektory (pracující na indexu lomu světla). Nejpoužívanější z nich jsou podrobněji přiblíženy v následující Kapitole 4.1.3. Kromě uvedených detektorů se také velmi často používá online připojený hmotnostní spektrometr. Veškerý proces je řízen řídicí jednotkou a v počítači jsou zaznamenány jednotlivé charakteristiky – retenční čas, intenzita píků při specifikované vlnové délce, MS spektrum a jiné [38, 40].

4.1.3. Konvenční detektory v HPLC

Absorpční fotometrické detektory (UV/VIS)

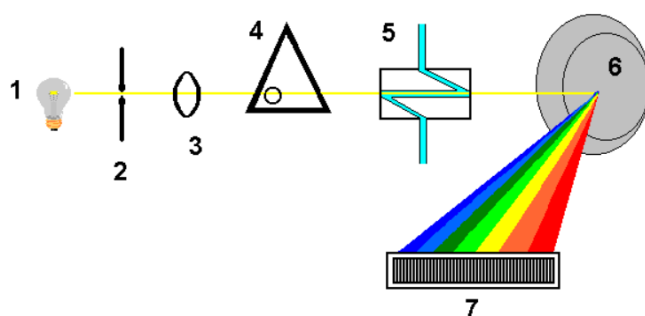
Spektrofotometrické detektory patří k nejpoužívanějším v HPLC, pracují na základě absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190–800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je dáno Lambertovým-Beerovým zákonem (projde-li záření o určité vlnové délce přes vzorek, který obsahuje látku schopnou toto záření absorbovat, dojde ke snížení intenzity prošlého záření, ale vlnová délka, resp. frekvence prošlého záření zůstává zachována) podle rovnice (4.1), kdy měřenou veličinou při průchodu světelného paprsku vzorkem je absorbance [38, 40].

$$A = \varepsilon_{\lambda} c l \quad \rightarrow \quad \varepsilon_{\lambda} = \frac{A}{lc} \quad (4.1)$$

A je absorbance, l je tloušťka absorbující vrstvy [cm], ε absorpční konstanta (molární dekadický absorpční koeficient) [$\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{l}$], c koncentrace absorbující složky [mol l^{-1}] [40].

Podle konstrukčního uspořádání mohou být UV/VIS detektory rozděleny na čtyři typy [40]:

- **Detektory s fixní vlnovou délkou** (nejčastěji 253,7 nm), jejímž zdrojem záření je nízkotlaková rtuťová výbojka.
- **Detektory s měnitelnou vlnovou délkou**, které mají předem stanovené vlnové délky.
- **Detektory s programovatelnou vlnovou délkou**, u nichž lze vlnovou délku měnit během analýzy, a to nejčastěji v rozmezí od 190 do 700 nm.
- **Detektory s diodovým polem** (PDA – Photodiode Array, DAD – Diode Array detector), které umožňují během analýzy zaznamenávat celé spektrum v reálném čase. Záření ze zdroje deuteriové výbojky (1) po průchodu štěrbinou (2), čočkou (3), clonou (4) a měrnou celou detektoru (5) je spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou (6), takže na každou z fotodiod (7) dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru (Obrázek 4.4) [40].



Obrázek 4.4 Schéma detektoru s diodovým polem [40]

Tyto detektory ve spojení s řídicí jednotkou (počítačem) umožňují detekci látky při libovolně zvolené vlnové délce (v rozsahu 190 až 800 nm), umožňují porovnávat snímaná spektra se spektry knihovny, a také vypočítají čistotu píku k identifikaci látky [40].

Fluorimetrické (fluorescenční) detektory (FLD)

Jedná se o velmi selektivní detektory s vysokou citlivostí (detekce až femtomolárních koncentrací analytu). Základním principem těchto detektorů je fluorescence a měření sekundárního (emisního) záření, které látka (analyt) vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního). Zdrojem excitačního záření může být rtuťová nebo xenonová výbojka, přičemž konstrukce fluorescenčního detektoru umožňuje zachycení maximálního množství fluorescenčního záření vznikajícího v cele detektoru násobičem. Ten je před dopadem excitačního záření chráněn nejen interferenčními filtry, ale také kolmým umístěním násobiče na zdroj excitačního záření [38, 40].

Elektrochemické detektory (ECD)

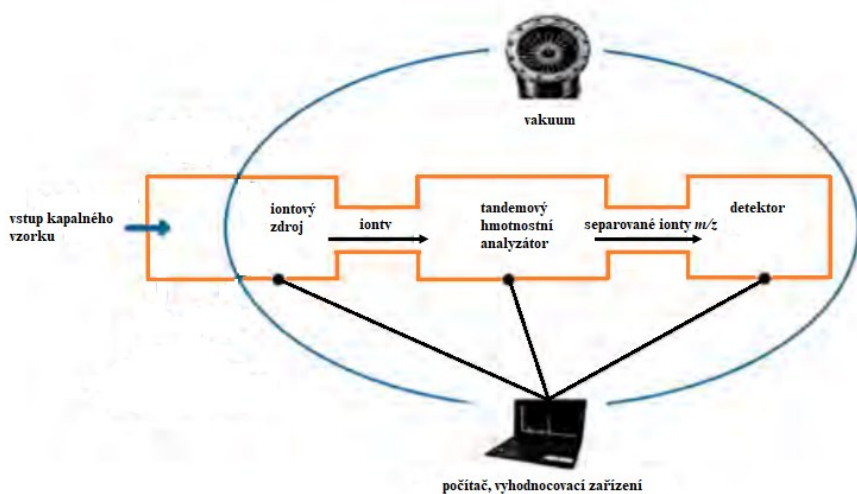
Používají se k detekci látek, a to v případě, že tyto látky jsou schopné elektrochemické (oxidačně-redukční) reakce probíhající na fázovém rozhraní elektroda–roztok (mobilní fáze). Podle fyzikálně-chemických vlastností analytu měří žádanou elektrickou veličinu (elektrodotový potenciál, proud) vyvolanou průchodem daného analytu průtokovou celou detektoru (obvykle tříelektrodotové zapojení) v němž je umístěna pracovní, pomocná a referenční elektroda s vloženým pracovním napětím. Měřená elektrická odpověď přímo odpovídá koncentraci sledované složky procházející detektorem, který umožňuje stanovit i velmi nízké koncentrace látek v eluentu [40].

4.2. Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC – MS/MS – Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) patří mezi špičkové instrumentální analytické techniky, která slouží ke kvantitativní a kvalitativní analýze organických i anorganických látek ve složitých biologických matricích jakými jsou krev, plazma nebo moč. Jedná se o univerzální, rychlou a zároveň extrémně citlivou a specifickou metodu, která je založena na vzájemném působení nabitých částic s magnetickým nebo elektrickým polem ve vakuu. Samotné propojení kapalinové chromatografie s MS prošlo v následujících desetiletích značným vývojem, přičemž v dnešní době se k analýze využívá několik různých technologií, což vede k mnoha různým typům hmotnostních spektrometrů, z nichž každý má svá pozitiva i negativa v oblasti diagnostiky [38, 43, 45].

Základní princip LC-MS/MS spočívá v převedení molekul analytu na pozitivně či negativně nabitě částice (ionty), s následnou analýzou iontů, které jsou vytvářeny během procesu ionizace na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (zkráceně m/Q , m/q , m/Z nebo m/z) a poté jsou kvalitativně a kvantitativně registrovány detektorem. Výstupem analýzy je hmotnostní spektrum, které graficky znázorňuje závislost četnosti iontů na hodnotě m/z [38, 45].

Každý LC-MS/MS se skládá ze zařízení iontového zdroje, ve kterém dochází k převedení vzorku do plynné fáze, což je prvotním kritériem pro veškeré následné kroky hmotnostní analýzy. Iontový zdroj ionizuje odpařené biologické vzorky, přičemž v případě propojení mezi kapalinovým chromatografem a hmotnostním spektrometrem bývá nejčastěji používanou ionizační technikou ionizace elektrosprejem. Iontovou drahou jsou poté ionty převáděny z atmosférického tlaku zdroje do vysokého vakua tandemového hmotnostního analyzátoru, kde dochází k separaci iontů na základě m/z . Tandemový hmotnostní analyzátor používá dva hmotnostní filtry uspořádaných postupně vedle sebe, mezi kterými je kolizní cella. V kolizní cele dochází ke srážce prekurzorových iontů s molekulami plynu, které jsou fragmentovány do menších iontů označovaných jako produktové ionty, a nakonec z iontového detektoru pro detekci a kvantifikaci iontů a vyhodnocovacího zařízení (Obrázek 4.5) [38, 43–45].



Obrázek 4.5 Základní instrumentální schéma tandemové hmotnostní spektrometrie [38]

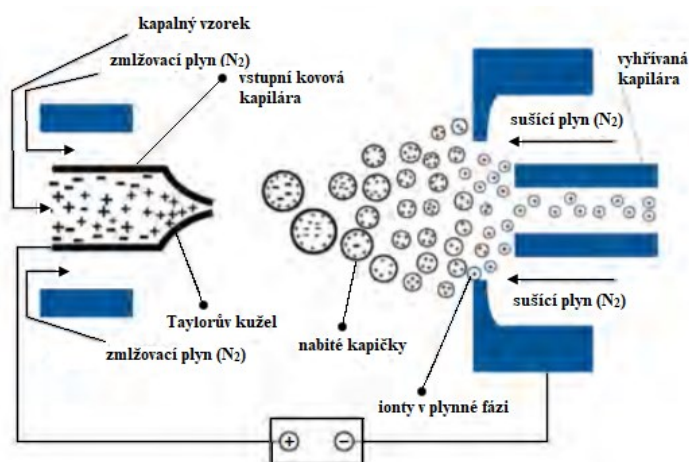
4.2.1. Iontový zdroj

Z důsledku značného zastoupení všech organických a bioorganických molekul neexistuje jedna všeobecná ionizační technika, která by byla vhodná pro všechna léčiva a jejich metabolity, a proto je nezbytné posoudit několik ionizačních technik v závislosti na polaritě sloučenin, molekulové hmotnosti, struktury aj. Daná látka, která podléhá analýze, může být ionizována působením zvýšené teploty, elektrickým polem, dopadem vysokoenergetických iontů, elektronů nebo fotonů. Iontový zdroj MS produkuje ionty v plynné fázi, které se mohou následně štěpit (fragmentovat). Z analytů, které vstupují do iontového zdroje zároveň s matricí (mobilní fáze z LC, doprovodné složky vzorku) se mohou vytvářet kladně nebo záporně nabitě ionty aduktové ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M-NH_4]^+$, apod.), nebo molekulární $[M^+]$, $[M^-]$. Iontové zdroje u kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií využívají tzv. „měkké“ ionizační techniky, které umožňují přímý převod analytů z kapalné do plynné fáze [38, 43, 47].

Elektrosprej (ESI)

Ionizace elektrosprejem (ESI – ElectroSpray Ionization) patří mezi „měkké“ ionizační techniky a je metodou volby polárních až iontových sloučenin. V současné době patří mezi nejrozšířenější zdroj ionizace, který podpořil velký rozmach v identifikaci metabolitů léčiv [46, 47].

ESI je standardní iontový zdroj, který spojuje LC s MS. Kapalné vzorky (mobilní fáze s analyty) přiváděny do hmotnostního spektrometru se čerpají kovovou kapilárou, kolem které proudí předehřátý dusík pro následné odpaření kapaliny. Na kapiláru je přiváděno za atmosférického tlaku silné elektrické pole (napětí 2–5 kV). Tím dochází ke vzniku tzv. Taylorova kužele, ze kterého se uvolňují nabitě kapky – aerosol, jež následně vstupují do vyhřívané kapiláry a na základě odpařování rozpouštědla dochází k jejich značnému zmenšování. Jakmile malé ionty dosáhnou vysokého povrchového náboje, odpudivé síly nábojů způsobí jejich roztržení neboli coulombickou explozi. Při dosažení určitého poloměru kapek na jistou mez nedochází k odpuzování shodně nabitých iontů, a proto ani k rozpadu kapek, čímž jsou ionty uvolňovány z jejich povrchu do plynné fáze a vstupují do analyzátoru. K rychlému odpařování a stabilnímu sprejování je využíváno koaxiálně proudícího inertního zmlžovacího plnu (Obrázek 4.6) [38, 43, 45].



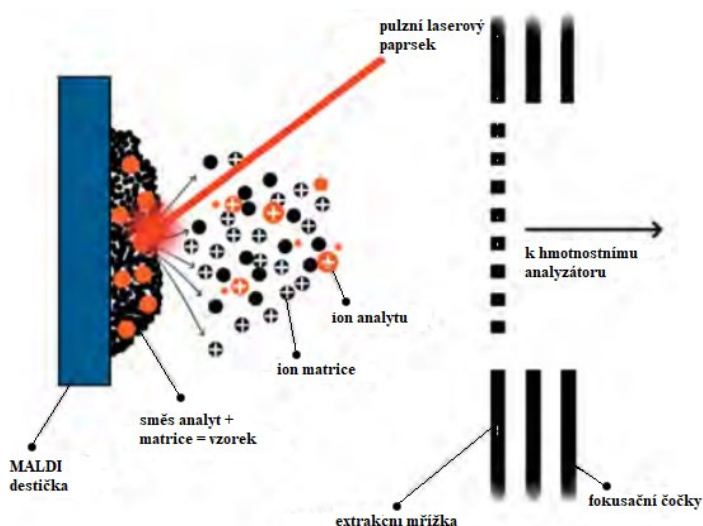
Obrázek 4.6 Schéma zobrazující základní princip ionizace elektrosprejem v tzv. pozitivním módu [38]

V tzv. negativním módu se místo vysokého kladného potenciálu přikládá na vstupní kovovou kapiláru potenciál záporný a v zásadě vznikají záporně nabitě ionty [38].

Laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (MALDI)

Jedna z dalších „měkkých“ a významných ionizačních technik u LC-MS/MS je desorpční ionizace vzorku laserem pomocí matrice (MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), avšak její úloha při identifikaci metabolitů léků není příliš vysoká [47].

Před ionizací je vzorek, jež je smíchán s nadbytkem matrice (nejčastěji organická kyselina) pro absorpci energii laseru a ionizace analytu, nanesen na kovovou destičku a umístěn do evakuovaného prostoru. Poté je ozařován krátkými intenzivními pulzy laseru, čímž dochází k zahřátí, excitaci a desorpci matrice a analytu. Současně excitovaná matrice předává náboj na desorbované molekuly analytu (transfer protonu), což způsobuje jejich ionizaci (Obrázek 4.7). Celý proces je uskutečňován ve vakuu, přičemž odpadá negativum s přenosem iontů mezi atmosférickým tlakem a vakuem tandemového analyzátoru [38, 43].



Obrázek 4.7 Zjednodušené schéma laserové desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (MALDI) [38]

4.2.2. Hmotnostní analyzátor

Po převedení molekul na ionty do plynné fáze je nezbytné pomocí analyzátoru separovat ionty na základě jejich poměru m/z . Pro tento proces bylo vyvinuto mnoho typů analyzátorů s několika odlišnými principy, avšak všechny využívají elektrické, nebo magnetické pole, eventuálně jejich kombinace [38].

Typičtí zástupci hmotnostních analyzátorů a jejich separačních procesy [38]:

- **Kvadrupólové analyzátory (Q)** – m/z (stabilita trajektorie iontů)

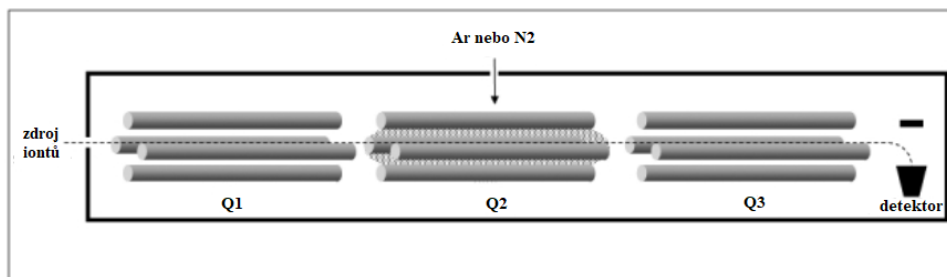
Kvadrupólové analyzátory jsou jedny z nejpoužívanějších v hmotnostní spektrometrii. Kvadrupól je tvořen čtyřmi paralelními tyčemi, z nichž na dvě protilehlé tyče je přiváděno buď kladné či záporné stejnosměrné napětí, přičemž na oba páry tyčí je zároveň přivedeno napětí střídavé (elektrody naproti sobě mají vždy stejnou polaritu). Optimálním nastavením napětí na obou párech tyčí v daném okamžiku umožňuje pohyb iontů s danou hodnotou m/z po stabilní trajektorii

směrem k detektoru či dalšímu analyzátoru. Ionty s nestabilní trajektorií jsou vyneseny z elektrického pole a uchyceny elektrodami. Gradient napětí zajišťuje let iontů ve směru axiální osy napříč hmotnostním spektrometrem [43].

- **Průletové analyzátor** (TOF) – rychlost (doba letu iontů)
- **Iontová past** (IT) – m/z (rezonanční frekvence)
- **Iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací** (FT-ICR) – m/z (rezonanční frekvence)
- **Elektrostatická iontová past** (Orbitrap, FT-OT) – m/z (rezonanční frekvence)

Výkonnost hmotnostního analyzátoru se hodnotí dle následujících charakteristik, kterými jsou jednak hmotnostní rozsah, transmise iontů, rychlost analýzy, přesnost měření m/z a rozlišení. Z výčtu zmiňovaných je důležité zmínit zejména přesnost měření hmoty, které se udává v ppm (parts per million) a vyjadřuje rozdíl mezi teoretickou hodnotou m/z a změřenou hodnotou m/z . Měření přesné hmoty je spjaté s rozlišením hmotnostního analyzátoru a s jeho stabilitou. Analyzátor s možností vysokého rozlišení (značná schopnost získat rozdílné signály pro ionty s nejmenší diferencí jejich m/z) obvykle poskytuje informace i elementárním složení iontů [38].

- **Tandemová hmotnostní spektrometrie** (MS/MS, MS², MS_n)
Metoda tandemové hmotnostní spektrometrie zahrnuje použití alespoň dvou hmotnostně-spektrometrických analyzátorů, které jsou propojeny disociačním procesem iontů v kolizní cele, anebo chemickou reakcí vyvolávající transformace náboje iontu nebo hmoty. MS-MS může pracovat v modu vícenásobných MS experimentů, které mohou být realizovány buď v čase nebo v prostoru [38]. Tandemové uspořádání v čase je nejčastěji realizováno pomocí iontové pasti (IT), kde dochází k zadržování iontu v prostoru analyzátoru. V jednom místě, ale v různých okamžicích je prováděna izolace iontů o vybraném poměru m/z a následně je uskutečňován kolizní experiment v kolizní cele, přičemž daný proces lze opakovat i se vznikajícími fragmenty [38]. Tandemové uspořádání v prostoru velmi často využívá trojitý kvadrupól (QqQ), jehož značnou výhodou je vysoká specifita, citlivost a robustnost. Jedná se o systém dvou kvadrupólů (Q1 a Q3), které pracují jako hmotnostní analyzátor, mezi nimiž je umístěn třetí kvadrupól sloužící jako kolizní cela (Q2) pro fragmentaci iontů. Přívodem vyššího tlaku (kolizního plynu) jsou urychlovány ionty elektrickým polem (kolizní energií). Tím dochází ke srážkám iontů letících z prvního kvadrupólu (prekurzorové ionty) s molekulami nebo atomy kolizního plynu (dusík, argon). Srážkami dochází ke zvýšení vnitřní energie iontu a následné fragmentaci na specifické fragmenty (produktové ionty), které postupně vstupují do druhého kvadrupólu (Obrázek 4.8). Tento proces je označován jako kolizně indukovaná disociace (CID) [43].

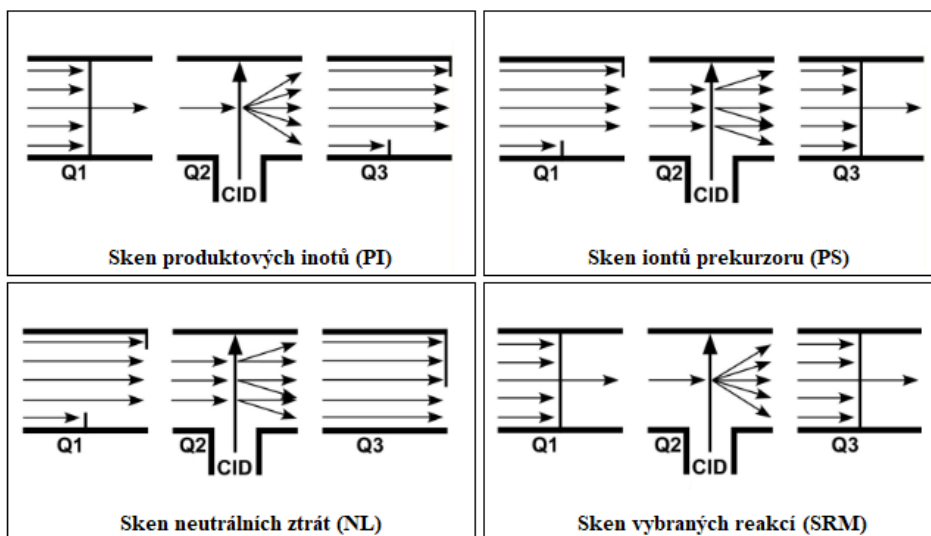


Obrázek 4.8 Trojitý kvadrupólový hmotnostní spektrometr [45]

Trojitý kvadrupól umožňuje analýzu v několika módech. Dle zvoleného módu lze jednotlivé kvadrupóly nastavit v režimu skenu či selektivního filtru a tyto přístupy různě kombinovat (Obrázek 4.9) [43, 44].

Sken produktových iontů (PI) první kvadrupól propouští ion se specifickým hodnotou m/z , který je posléze fragmentován v kolizní cele. Třetí kvadrupól je nastaven v režimu skenování v definovaném rozsahu m/z . Tento sken se používá pro identifikaci látek analytu [43].

Sken iontů prekursoru (PS) první kvadrupól skenuje celý rozsah spektra a všechny fragmenty propouští do kolizní cely, kde jsou následně fragmentovány. Třetí kvadrupól propouští pouze fragmenty o určitém m/z , ze kterých lze zjistit ion prekursoru z něhož vnikl [43].



Obrázek 4.9 Možnosti nastavení trojitého kvadrupólu [44]

Sken neutrálních ztrát (NL) oba kvadrupóly současně skenují ionty s konstantním rozdílem m/z , čímž lze zjistit hmotnostní ztrátu neutrálního fragmentu (neutrální molekuly iontů prekursoru a produktu) vzniklého v kolizní cele [43].

Sken vybraných reakcí (SRM) je nejčastěji využívaným módem, při kterém jsou oba kvadrupóly použity jako selektivní filtry. V prvním kvadrupólu je vybrán iont prekursoru a následně v kolizní cele fragmentován za podmínek nejnižší optimální kolizní energie pro produkt nejintenzivnější, a v třetím kvadrupólu je vybrán pouze fragmentový ion. Jedná se o velmi selektivní a vysoce citlivý mód, přičemž SRM je vhodný zejména pro kvantitativní analýzu. V praxi se můžeme setkat i s označením (MRM) [43].

4.2.3. Detektor a vyhodnocovací zařízení

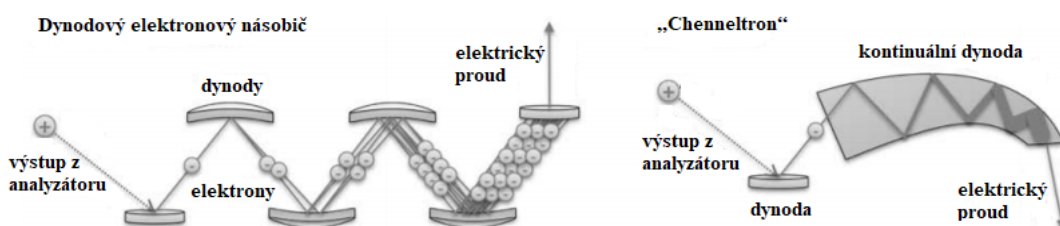
Poté, co jsou ionty separovány hmotnostním analyzátozem, jsou zaznamenány pomocí detektoru a signál je převeden do digitálního formátu. Princip detektorů spočívá ve schopnosti generovat elektrický proud, který je úměrný četnosti dopadajících iontů. V zásadě lze detektory rozdělit do dvou skupin podle schopnosti detekce iontů [38].

Detekce iontů bez ohledu na velikost m/z

Do této skupiny jsou řazeny detektory, které umožňují přímé měření elektrického proudu, jež vzniká následkem srážky iontu s dynodou a pomocí násobičů je zesilován. Nejběžněji používanými typy jsou elektronové násobiče, které zesilují elektrony pomocí několika dynod nebo kontinuálním dynodovým násobičem tzv. „channeltron“ (Obrázek 4.10) [43].

Detekce iontů s ohledem na velikost m/z

Tyto detektory zaznamenávají ionty jako komplexní „proudový obraz“ u všech iontů s odlišnými hodnotami m/z pomocí indukce proudu vlivem pohybu iontů v hmotnostním analyzátoru, přičemž signál je dále zpracováván Fourierovou transformací. Patří zde iontově cyklotronová rezonance a orbitrap [43].



Obrázek 4.10 Detektory MS/MS [43]

Vyhodnocovacím zařízením je signál zpracován, čímž je získáno hmotnostní spektrum, které popisuje chemickou reaktivitu iontů v plynné fázi a transportní i elektrochemické procesy ve fázi kondenzované. V tomto případě se nejedná o konstantu, protože mezi způsobem ionizace a konstrukcí hmotnostního spektrometru existuje přímá závislost [38].

U „měkkých“ ionizačních technik obsahují hmotnostní spektra minimální množství fragmentů, avšak značný počet iontů vyvstává buď z rozpouštědla (ESI), nebo z matrice (MALDI), resp. z kontaminace iontového zdroje, čímž jsou výsledná spektra velmi komplexní. Každý ion dopadající na detektor je v hmotnostním spektru zaznamenáván samostatně. Jestliže jsou obsaženy v molekule přirozené izotopy prvků, tak je vyhledávaný analyt pokaždé přítomen na několika poměrech m/z v závislosti na počtu a hmotnosti izotopů. Z důvodu konstantního zastoupení izotopů v přírodě lze použít profil izotopických píků pro stanovení počtu atomů v molekule [38].

5. Přehled prací zabývajících se HPLC a LC-MS/MS analýzou busulfanu

Následující kapitoly jsou věnovány přehledu výzkumných prací, které se zabývají HPLC a LC-MS/MS analýzou busulfanu v plazmě zejména IV formulace. Hlavní pozornost byla u obou metod zaměřena na použití chromatografických podmínek obzvláště na typ kolony, složení mobilní fáze, použití vnitřního standardu, způsobu detekce, retenčních časů a hmotnostních přechodů. Z hlediska porovnání použitých metod na přesnost, správnost, citlivost a rychlost. Jednotlivé práce byly seřazeny chronologicky od nejstarších.

5.1. Aplikace HPLC metod v medicíně pro stanovení busulfanu v plazmě

Deeg et al. testovali vzorky plazmy psů, jímž byla dávkována intravenózní forma busulfanu. Analýzu prováděli systémem HPLC s menšími modifikacemi. Pro čistotu vzorku byla provedena extrakce na pevné fázi pomocí kazety Bond Elut C8. Při derivatizaci byl busulfan přeměněn na 1,4-diiodobutan. Separace 1,4-diiodobutanu byla dosažena izokratickým HPLC systémem za použití ochranné kolony 5 mm LiChrosorb C a analytické kolony Gromsil 100-CNN. Mobilní fáze byla složena z vody a acetonitrilu v poměru 78:22. Fotochemická derivatizace byla provedena teflonovým reaktorem, jež umožnila detekci derivátu busulfanu při 226 nm s retenčním časem 16,5 minut. Tuto metodu označili za vysoce selektivní a studii na psech stanovili myeloablativní dávku IV busulfanu [49].

Hara et al. stanovili busulfan v lidském séru pomocí fluorimetrické vysoce výkonné kapalinové chromatografie (FLD-HPLC). Jako vnitřní standard byl použit 1,6-bis (methansulfonyloxy) hexan. Chromatografická separace byla provedena na reverzní fázi s použitím předkolony YMC-Pack C4 10 x 4,0 mm, 5,0 μm a kolony YMC-Pack C4 150 x 4,6 mm, 5,0 μm . Mobilní fáze tvořila směs 0,1 mol/l methanolu s pufrům octanu sodného (pH 7,0) v poměru 8:2. Injektovaný objem byl 10 μl . Detekce byla provedena spektrofluorometricky při 370 nm s excitací při 255 nm. Retenční čas pro busulfan byl 6,3 minut a pro vnitřní standard 9,3 minut. Autoři vyvinuli jednoduchou, přesnou a vysoce citlivou metodu [50].

Moreno et al. použili pro kvantifikaci busulfanu ve vzorcích plazmy krys FLD-HPLC. Vnitřní standard byl použit 1,5-bis (metansulfoniloxo) pentan. Separace byla provedena za pomoci kolony C18 Nova-Pak, 15 cm x 3,9 mm. Kolona byla vybavena předkolonou Tecnokroma C135B, se dvěma filtry 2 mm a plnicím pórovým filmem C18 s velikostí částic 40 μm . Mobilní fáze se skládala ze směsi acetátového pufru (pH = 5) a acetonitrilu v poměru 45:55. Detekce probíhala při excitaci 360 nm a emisi 425 nm. Retenční čas pro busulfan byl 10,34 minut a pro vnitřní standard 10,46 minut. Použitá analytická metoda měla přesnosti a reprodukovatelnosti [50].

Rewaria a Swamy vyvinuli a validovali reverzní fázovou vysokotlakou kapalinovou chromatografii (RP-HPLC) pro stanovení busulfanu. Agilent HPLC 1260 byl vybaven detektorem diodového pole (PDA) a kolonou C18 150 x 4,6 mm, 3 μm . Analýza byla prováděna při 280 nm. Mobilní fáze byla použita v izokratickém režimu a smíchána z acetonitrilu, destilované vody a tetrahydrofuranu v poměru 66:32:2. Jako ředidlo byl použit methanol. Vnitřním standardem byl údajný referenční materiál z Indie. Retenční čas byl okolo 14 minut. Tato nová metoda byla shledána přesnou

a reprodukovatelnou [51].

Tesfaye et al. prováděli výzkum, v němž se zabývali variabilitou IV busulfanu a důležitostí jeho TDM, které bylo prováděno systémem HPLC. Jako vnitřní standard byl použit 1, 6-butandiol bis-(methylsulfonyloxy) hexan. Separace byla provedena pomocí kolony Supelcosil LC-18 10 cm x 4,6 mm, 5 μ m. Mobilní fáze byla složena z methanolu a destilované vody v objemovém poměru 3:1. Detekce UV detektorem byla provedena při 256 nm. Retenční časy byly 5,8 minut pro busulfan a 11,8 minut pro vnitřní standard. Tato metoda separovala a stanovila koncentrace busulfanu 62 vzorků, přičemž AUC byla vypočtena dle lichoběžníkového pravidla a poukázala tak na významnost monitorování busulfanu AUC mezi jednotlivými dávkami [20].

5.2. Aplikace LC-MS/MS metod v medicíně pro stanovení busulfanu v plazmě

Reis et al. vyvinuli rychlou, přesnou a citlivou metodu pro kvantifikaci busulfanu s použitím LC-MS/MS vybaveným iontovým zdrojem ESI. Jako vnitřní standard byl použit 1,6-bis (metansulfonyloxy) hexan. HPLC separace byla prováděna za použití kolony Nova-Pak C18 150 x 3,9 mm, 4,0 μ m. Izokratická mobilní fáze byla namíchána z 20 mmol/l octanu amonného a methanolu v poměru 60:40 obsahující 0,1% kyselinu mravenčí. Do tandemového hmotnostního spektrometru bylo vstříkováno 40 μ l vzorku a hmotnostní přechod pro busulfan byl sledován při m/z 264,1 \rightarrow 150,8 a 292,1 \rightarrow 83 pro vnitřní standard. Retenční časy pro busulfan a vnitřní standard byly 1,81 minut a 2,65 minut. Celková doba analýzy trvala 3,5 minut [52].

Hongxia et al. pro kvantifikaci busulfanu v plazmě porovnávali metody HPLC-FL a LC-MS. Pro HPLC analýzu byl použit vnitřní standard 1,8-bis (metansulfonyloxy) oktan. Separace byla provedena na koloně s reverzní fází Gemini C18 100 x 4,6 mm, 3 μ m, Mobilní fáze obsahovala (rozpouštědlo A) 0,1 mol roztok kyseliny amonné (pH = 7. 0), (rozpouštědlo B) 100% acetonitril a (rozpouštědlo C) 100% methanol. FL detektor byl nastaven na vlnovou délku 255 a 370 nm. Během studie bylo injektováno 25 μ l vzorku. Retenční časy busulfanu a vnitřního standardu byly 15,7 minut a 25,2 minut. Pro LC-MS analýzu byl použit vnitřní standard [2H8] -sulfan. Separace busulfanu byla provedena za použití stejné kolony jako u HPLC analýzy. Mobilní fáze obsahovala 10 mmol/l octanu amonného a 10 ml/l kyseliny octové ve vodě a acetonitrilu 30:70. Hmotnostní spektrometr byl vybaven zdrojem ESI. Busulfan a [2H8] -sulfan byly detekovány jako amonné adukty při m/z 264,2 resp. 272,2. Retenční čas busulfanu a [2H8] -sulfanu byl 4,1 minut. Statistickým porovnáním plazmatických koncentrací busulfanu stanovených HPLC a LC-MS nebylo prokázáno významného rozdílu mezi koncentracemi měřenými dvěma testy. Korelační koeficient byl 0,9994. Oba testy byly stanoveny za přesné a citlivé [53].

Ansari et al. měřili busulfan metodou LC-MS/MS za použití d8-busulfanu jako vnitřního standardu. Chromatografie byla prováděna na koloně Phenomenex Kinetex C18 50 x 2,1 mm, 2,6 μ m. Mobilní fáze (rozpouštědlo A) obsahovala 10 mmol/l mravenčanu amonného, 0,1% kyseliny mravenčí a 5 % acetonitrilu ve vodě (měřeno pH bylo 3,7). Mobilní fáze (rozpouštědlo B) obsahovala acetonitril. Do systému LC-MS/MS bylo injektováno 5 μ l vzorku. Hmotnostní spektrometr byl provozován v režimu více reakcí (MRM) v pozitivním módu s ionizací elektrosprejem ESI. Přechody MRM byly 264,1 \rightarrow 151,1 pro busulfan a 272,1 \rightarrow 159,1 pro vnitřní standard. Retenční časy pro busulfan a d8-busulfan

byly 2,9 minut a 2,91 minut. Celková doba běhu byla nastavena na 7 minut. Metoda byla interně validována [54].

Desire et al. analyzovali busulfan v plazmě pomocí LC-MS/MS za použití ionizace ESI v pozitivním módu. Jako vnitřní standard (IS) byl použit d8-busulfan. Separace HPLC byla prováděna za použití kolony Gemini C6 50 x 2,0 mm, 5,0 μ m ve spojení s ochrannou kolonou C18 4 mm x 3,0 mm. Mobilní fáze byla použita v binární gradientové eluci a sestávala z 10 mmol/l octanu amonného a acetonitrilu v poměru 40:60. Do systému LC-MS/MS bylo injektováno 10 μ l vzorku. Kvantifikace proběhla v režimu MRM s přechodem m/z 264,1 \rightarrow 151,0 pro busulfan a 272,1 \rightarrow 159,1 pro d8-busulfan. Jejich retenční časy byly 1,24 minut a 1,23 minut. Celková doba analýzy trvala 5 minut. Metoda byla validována a označena za rychlou a citlivou [55].

Autoři Moon et al. kvantifikovali koncentrace busulfanu v plazmě pomocí systému LC-MS/MS. Jako IS byl použit glipizid. Vzorek byl analyzován LC systémem Agilent 1260 Infinity vybavený kolonou XBridge C18 2,1 x 100 mm, 3,5 μ m. Jako mobilní fáze byla zvolena směs 0,1% kyselina mravenčí s 2 mmol/l octanem amonným v destilované vodě (rozpouštědlo A) nebo methanolu (rozpouštědlo B) v gradientovém módu eluce. Retenční čas byl 2,27 minut pro busulfan a 4,89 minut pro IS. LC systém byl spojen s trojitým kvadrupólem MS/MS, Agilent 6490 vybaveným iontovým zdrojem ESI, který byl provozován v pozitivním módu a kvantifikace byla prováděna v režimu MRM s přechodem m/z při 264,1 \rightarrow 151,1 pro busulfan a 446,1 \rightarrow 321,1 pro IS. Injekční objem byl 2 μ l. Celková doba analýzy byla nastavena na 10 minut. Vyvinutá metoda byla validována a shledána přesnou, reprodukovatelnou a relativně krátkou [24].

Ialongo et al. monitorovali busulfan v plazmě pomocí LC-MS/MS s izokratickou separací a on-line extrakcí v pevné fázi (SPE), kterou následně porovnávali s LC-MS/MS s izokratickou separací a off-line extrakcí na fázi kapalně (LL). Jako vnitřní standard byl použit busulfan-d8. Pro on-line extrakci a chromatografii byl použit systém HPLC Dionex Ultimate 3000. On-line SPE extrakce byla provedena na koloně Restek Pinnacle II C18 5 μ m, 10 mm x 2,1 mm SPE patroně a chromatografická separace byla provedena na koloně Restek Pinnacle II C18 5 μ m, 100 mm x 2,1 mm. Pro extrakci SPE byla mobilní fáze (A) tvořena roztokem 20 mmol/l octanu amonného a methanolu v objemovém poměru 95:5. Zatímco pro eluci SPE a izokratickou separací na analytické koloně mobilní fáze (B) sestávala z roztoku 20 mmol/l octanu amonného a 0,1% kyseliny mravenčí s methanolem v poměru 20:80. Pro detekci byl v MRM pozitivním režimu použit trojitý kvadrupól API 4000 Qtrap vybavený iontovým zdrojem (ESI). Hmotnostní přechod m/z pro busulfan byl 264,1 \rightarrow 151,1 a pro busulfan-d8 272,1 \rightarrow 159,1. Retenční čas jak pro busulfan, tak pro busulfan-d8 byl 1,58 minut. Objem nástriku byl 10 μ l. Celková doba analýzy byla 4 minuty. U druhé metody byla chromatografická analýza provedena na koloně Restek Pinnacle II C18 5 μ m, 100 mm x 2,1 mm. MF obsahovala 20 mmol/l octanu amonného a methanolu v poměru 30:70. Objem nástriku byl 10 μ l. HPLC systém (s vyloučením pomocného čerpadla a přepínacího ventilu) a nastavení hmotnostního spektrometru bylo stejné jako u on-line LC-MS/MS. Předložená nová metoda by mohla úspěšně nahradit metodu LC-MS/MS off-line extrakcí bez statistiky významných rozdílů a mohla by být implementována do klinické praxe pro rutinní analýzu busulfanu v plazmě [56].

6. Experimentální část

6.1. HPLC – Přístroje, pomůcky a chemikálie

6.1.1. Přístroje

- a) HPLC sestava Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, USA):
- Vysoce výkonný odplyňovač (Agilent 1260 High Performance Degasser)
 - Kvartérní čerpadlo (Agilent 1260 Infinity Quaternary Pump)
 - Autosampler (ALS – Agilent 1260 Infinity Standard Autosampler)
 - Termostat kolony (TCC – Agilent 1260 Infinity Thermostatted Column Compartment)
 - Detektor diodového pole (DAD – Agilent 1260 Infinity Diode Array Detector)



Obrázek 6.1 HPLC sestava Agilent 1260 Infinity

- b) Kolona Supelcosil LC-18 10 cm x 4,6 mm, 5 μ m (Sigma-Aldrich)



Obrázek 6.2 Kolona Supelcosil LC-18 10 cm x 4,6 mm, 5 μ m

- c) Analytické váhy Kern ALT 100-5AM (Kern)
d) Ultrazvuková lázeň (Tesla)
e) Vortex (Velp-Scientifica)
f) Evaporátor (ECOM)
g) pH metr Eutech Instruments pH 510, Cyberscan (Chromservis)

- h) centrifuga MPW-260R (Med. Instruments)
- i) PC s vyhodnocovacím programem Open Lab (Agilent Technologies, USA)

6.1.2. Pomůcky

- a) Automatické pipety (Biohit)
- b) Špičky
- c) Eppendorfký
- d) Kádinky
- e) Odměrné baňky
- f) Odměrné válce
- g) Skleněné zkumavky (10 ml)
- h) Váženka
- i) Stříčka s destilovanou vodou
- j) Vialky s uzávěry (Agilent Technologies)
- k) Skleněné láhve (1 l)

6.1.3. Chemikálie

- a) Metanol, for HPLC, gradient grade, $\geq 99,9\%$ (Honeywell)
- b) Acetonitril, for HPLC, $\geq 99,9\%$ (Honeywell)
- c) 1,6-bis (methanesulfonil-oxy) hexan (připraveno v Brně)
- d) Sodium Diethyldithiocarbamate 3-hydrate BioChemica (AppliChem Pameac)
- e) Octan sodný (Lachema N.P. Brno)
- f) Kyselina octová – 20%
- g) Ethylester kyseliny octové (Penta)
- h) pH 4 Buffer (Sigma-Aldrich)
- i) pH 7 Buffer (Sigma-Aldrich)
- j) Destilovaná voda (Biotech)

6.1.4. Příprava reagensů a vzorků

Reagencie a vzorky pro HPLC analýzu busulfanu jsem připravila na základě zavedené metody pro TDM busulfanu na Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole, v Praze.

Promývací roztok

Promývací roztok pro HPLC sestavu jsem připravila smícháním destilované vody a metanolu v poměru 1:1.

Příprava mobilní fáze

Pro přípravu jednoho litru roztoku mobilní fáze jsem odměřila v odměrném válci 750 ml metanolu a toto množství bylo následně smícháno s 250 ml destilované vody.

Příprava roztoků

Namíchala jsem směs metanol – acetonitril v poměru 2:1. Pomocí 250 ml odměrného válce jsem odměřila 200 ml metanolu a 100 ml acetonitrilu. Odměřené roztoky jsem následně vlila do lirové skleněné uzavíratelné nádoby, kterou jsem skladovala po celou dobu měření v lednici při teplotě 2 až 8 °C. Tyto skladovací podmínky by měly zajistit potřebnou stabilitu a předejít jejich předčasné degradaci. Dále jsem si při každém měření odměřila na analytických vahách 0,5 g diethyldithiokarbanové kyseliny, kterou jsem v odměrné baňce smíchala s 10 ml destilované vody. V neposlední řadě jsem na analytických vahách odměřila pomocí váženky 1,4 g octanu sodného, který jsem posléze v kádince smíchala se 100 ml destilované vody. pH roztoku jsem upravila pomocí 20% kyseliny octové na konečnou hodnotu pH 6,05 (požadované rozmezí pH se pohybovalo okolo 5,5–6,5). Roztok jsem taktéž po celou dobu měření uchovávala v lednici.

Příprava vnitřního standardu (IS)

Jako vnitřní standard pro stanovení busulfanu byl zvolen roztok 1,6-bis (methanesulfonil-oxy) hexanu s metanolem. Na analytických vahách jsem navážila 0,00300 g práškového IS, který jsem rozpustila v 50 ml metanolu. Tím jsem získala zásobní roztok vnitřního standardu o koncentraci 60 µg/ml.

Příprava kontrol

Kontroly kvality byly připraveny na základě doporučených hodnot dle interního předpisu ÚLCHKB uvedených v nadcházející tabulce:

Tabulka 6.1 Hladiny kontrolních roztoků busulfanu pro HPLC analýzu

Název kontroly	Rozmezí [ng/ml]	Střed [ng/ml]
kontrola 1	336–504	420
kontrola 2	1200–1800	1500
kontrola 3	2400–3600	3000

Kontroly jsem připravila ze zásobního roztoku busulfanu o koncentraci 60 µg/ml. Tento roztok jsem získala z nemocniční lékárny (Busilvex) a z tohoto roztoku se připravují infuze pro pacienty. Každá kontrola byla připravována v objemu 10 ml.

Pro výpočet objemu zásobního roztoku jsem vycházela ze směšovací rovnice:

$$V1 \cdot c1 = V2 \cdot c2 \rightarrow V1 = c2 \cdot V2 / c1 \quad (6.1)$$

kde V1 je objem zásobního roztoku, c2 je výsledná koncentrace roztoku kontroly, V2 je objem 10 ml (10 000 µl) a c1 je koncentrace zásobního roztoku IS (60 000 ng/ml).

Tabulka 6.2 Příprava kontrol busulfanu pro HPLC analýzu

Název kontroly	Zásobní roztok [µl]	Sérum [µl]	Koncentrace [ng/ml]
kontrola 1	70	9930	420
kontrola 2	250	9750	1500
kontrola 3	500	9500	3000

Příprava kalibračních roztoků

Pro busulfan byla připravena sedmibodová lineární kalibrace. Kalibrace byla připravena ze směsného lidského séra obohaceného zásobním roztokem busulfanu. Kalibrační roztoky byly připraveny dle následující tabulky:

Tabulka 6.3 Příprava kalibračních roztoků pro busulfan pro HPLC analýzu

Název kalibrátoru	Zásobní roztok [μ l]	Sérum [μ l]	Koncentrace busulfanu [ng/ml]
blank	–	2000	0
Zásobní roztok busulfanu o koncentraci 6 μg/ml (6000 ng/ml)			
1	40	1960	120
2	120	1880	360
3	200	1800	600
Zásobní roztok o koncentraci 60 μg/ml (60 000 ng/ml)			
4	40	1960	1200
5	80	1920	2400
6	100	1900	3000

Příprava vzorků

Do skleněných zkumavek jsem napipetovala 20 μ l vnitřního standardu. Do zkumavek s IS jsem přidala 700 μ l séra, kontroly či kalibrátoru a směs jsem po dobu 30 s promíchala na vortexu. Pro precipitaci bílkovin jsem přidala do vzorku 1,5 ml směsi methanolu a acetonitrilu (2:1). Poté jsem ke směsi přidala 0,5 ml připraveného roztoku diethyldithiokarbamové kyseliny a 2,0 ml octanu sodného (pH 6,05), čímž došlo k derivatizaci vzorku. Směs jsem po dobu 15 s promíchala na vortexu. Směs jsem extrahovala přidáním 3,0 ml ethylesteru kyseliny octové, intenzivně jsem vortexovala po dobu 2 minut a pak jsem směs ve zkumavkách odstředila pomocí laboratorní centrifugy při 3000 otáčkách/min po dobu 10 minut. Po odstředění jsem 2,5 ml organické vrstvy přenesla do užších zábrusových zkumavek a extrakt jsem odpařila do sucha při 65 °C pod proudem dusíku v evaporátoru (Obrázek 6.3). Vysušený zbytek či odparek jsem následně rozpustila ve 100 μ l metanolu. Do vialek s inserty jsem přepipetovala rozpuštěný odparek v metanolu, vialky jsem zavičkovala a vložila do přístroje k analýze metodou HPLC. Celková doba přípravy jedné série vzorků se pohybovala okolo 3 hodin.



Obrázek 6.3 Evaporátor

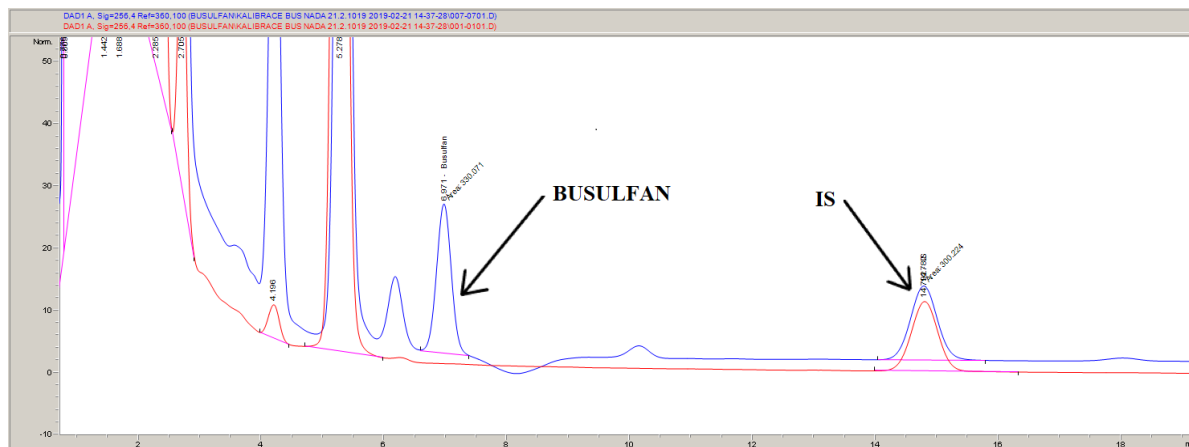
6.1.5. HPLC analýza – chromatografické podmínky separace a detekce

Optimální chromatografické podmínky (Obrázek 6.4) separace pro stanovení busulfanu v séru pomocí HPLC s UV detekcí jsem nastavila na základě zavedené metody Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol, v Praze. HPLC systém se skládal z kvartérní pumpy s detektorem diodového pole s použitím automatického vzorkovacího systému. Pro chromatografickou analýzu byla zvolena kolona Supelcosil LC-18 10 cm x 4,6 mm, o velikosti částic 5 µm. Analýza probíhala při teplotě 22,0 °C. Mobilní fáze sestávala z metanolu a destilované vody (75:25). Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 1,2 ml/min. Detekce byla prováděna pomocí DAD detektoru při 256 nm, kde by mělo být absorpční maximum pro busulfan a vnitřní standard. Objem nástriku na kolonu byl nastaven na 20 µl. Celková doba analýzy byla nastavena na 18 minut při tlaku cca 115 barů.



Obrázek 6.4 Podmínky HPLC analýzy

Chromatogramy byly zpracovány softwarem Open Lab, verze B.02.03 (Agilent Technologies). Z průběhu HPLC analýzy (Obrázek 6.5) je patrné, že v retenčním čase busulfanu neinterferuje žádná látka. Červená křivka představuje chromatogram blanku (slepého vzorku), což je pacientský vzorek séra s nulovou koncentrací busulfanu připravený stejným postupem jako ostatní vzorky.



Obrázek 6.5 Průběh HPLC analýzy: pacientský vzorek (modrá eluční křivka), blank (červená eluční křivka)

6.2. LC – MS/MS – Přístroje, pomůcky a chemikálie

6.2.1. 6.2.1 Přístroje

LC – MS/MS systém s trojitým kvadrupólem Agilent 6470 (Agilent Technologies, USA):

- Iontový zdroj (AJS-ESI – Agilent 6470 Jet Stream – ElectroSpray Ionization)
- Trojitý quadrupól (QqQ – Agilent 6470 Triple Quadrupole)



Obrázek 6.6 LC-MS/MS s trojitým kvadrupólem Agilent 6470

- Kolona EclipsePlus C18, RRHD 1,8 μm , 2,1 x 50 mm (Agilent Technologies)
- Vortex (Velp-Scientifica)
- centrifuga 5417R (Eppendorf)
- PC s vyhodnocovacím programem MassHunter (Agilent Technologies)

6.2.2. Pomůcky

- automatické pipety (Biohit)
- špičky
- odměrné válce
- vialky s uzávěry (Agilent Technologies)
- skleněné láhve (1 l)

6.2.3. Chemikálie

- metanol, LC – MS Chromasolv, $\geq 99,9 \%$ (Honeywell)
- fluorid amonný (Sigma-Aldrich)
- busulfan – d8 (TRC Canada)
- destilovaná voda (Biotech)

6.2.4. Příprava reagensů a vzorků

Reagencie a vzorky pro analýzu busulfanu LC-MS/MS jsem připravovala na základě zavedené metody pro TDM busulfanu Ústavem lékařské chemie a klinické biochemie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole, v Praze.

Promývací roztok

Promývací roztok do LC-MS/MS sestavy jsem připravila smícháním destilované vody a metanolu v poměru 1:1.

Příprava mobilní fáze A a B

Mobilní fázi A jsem připravila pomocí odměrného válce, ve kterém jsem odměřila 300 ml destilované vody, tu jsem vlila do skleněné nádoby, do níž jsem přidala 300 µl roztoku fluoridu amonného.

Mobilní fázi B jsem připravila stejným postupem, odměřila jsem 300 ml metanolu, který jsem smíchala s 300 µl roztoku fluoridu amonného.

Příprava vnitřního standardu (IS)

2,5 mg práškového busulfanu d8 bylo rozpuštěno v 250 ml 80% acetonitrilu. Tím se získal zásobní roztok o koncentraci 1000 ng/ml, který se dále ředí na pracovní roztok o koncentraci 100 ng/ml. Takto připravený roztok je uchováván v mrazicím boxu při teplotě -20°C

Příprava kontrol

Kontrolní materiály na třech hladinách byly také připraveny stejným způsobem, jak bylo uvedeno u HPLC analýzy a uloženy ve zkumavkách typu eppendorf v mrazicím boxu při teplotě -20°C . Každá kontrola byla připravena v objemu 50 µl.

Tabulka 6.4 Hladiny kontrolních roztoků busulfanu pro LC-MS/MS analýzu

Název kontroly	Rozmezí [ng/ml]	Střed [ng/ml]
kontrola 1	336–504	420
kontrola 2	1200–1800	1500
kontrola 3	2400–3600	3000

Příprava kalibračních roztoků

Pro busulfan byla připravena devítibodová lineární kalibrace. Kalibrace byla připravena ze směsného lidského séra obohaceného zásobním roztokem busulfanu. Kalibrační roztoky byly připraveny dle následující tabulky:

Tabulka 6.5 Příprava kalibračních roztoků busulfanu pro LC-MS/MS analýzu

Název kalibrační řady	Zásobní roztok [μl]	Sérum [μl]	Koncentrace busulfanu [ng/ml]
Zásobní roztok o koncentraci 0,06 μg/ml (60 ng/ml)			
blank	–	50	0
Zásobní roztok o koncentraci 0,6 μg/ml (600 ng/ml)			
1	40	160	12
2	20	180	60
Zásobní roztok o koncentraci 6 μg/ml (6 000 ng/ml)			
3	40	160	120
4	12	188	360
5	20	180	600
6	40	160	1200
7	80	120	2400
Zásobní roztok o koncentraci 60 μg/ml (60 000 ng/ml)			
8	12	188	3600

Příprava vzorků

Do zkumavek typu eppendorf jsem k 50 μl patientského vzorku, kontroly nebo kalibrátoru, napipetovala 450 μl deuterizovaného vnitřního standardu o koncentraci 100 ng/ml. Vzorky jsem po dobu 30 vteřin promíchala na vortexu. Vzorky jsem následně vložila do chlazené centrifugy a centrifugovala po dobu 10 minut při 13000 otáček/min. Do vialek s inserty jsem přepipetovala 200 μl supernatantu vzorku, vialky jsem zavíčkovala novými víčky a vložila do přístroje k analýze LC-MS/MS. Celková příprava jedné sady vzorků trvala zhruba 15 minut.

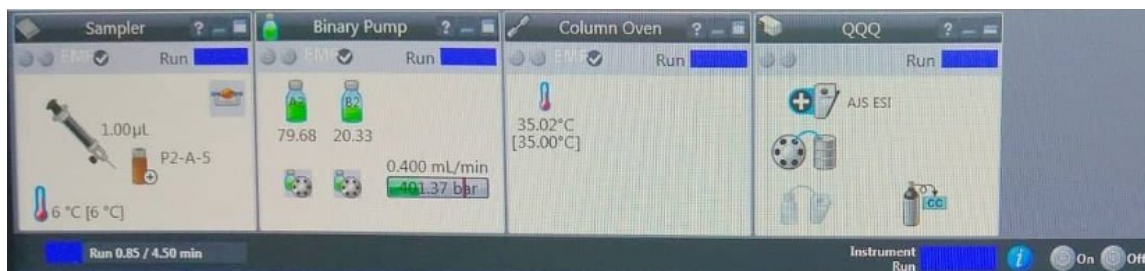
6.2.5. LC-MS/MS analýza – chromatografické podmínky separace a detekce

Optimální chromatografické parametry pro stanovení busulfanu v séru pomocí LC s trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem (MS/MS), jsem nastavila na základě zavedené metody Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol, v Praze.

Analýzu jsem prováděla pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií za použití ionizace elektrosprejem (AJS-ESI) v pozitivním módu.

Chromatografická separace probíhala na koloně EclipsePlus C18, RRHD 1,8 μm, 2,1 x 50 mm při teplotě 35 °C pomocí gradientové eluce tvořenou mobilní fází A (destilovaná voda s 0,1% roztokem NH₄F) a mobilní fází B (100% metanol s 0,1% roztokem NH₄F). Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min. Pro zvýšení eluční síly docházelo během separace ke změnám ve složení mobilních fází. V čase 0 minuty byl objem MF A nastaven na 95 % a MF B na 5 %, v čase 2,5 minuty dosahovaly MF A i MF B 50 %, v čase 3 minuty byla MF A pozastavena tj. 0 % a MF B dosáhla plných 100 % a v čase 3,10–4,50 minut byla MF A nastavena na 95 % a MF B na 5 %. Objem nástřiku na kolonu byl 1,00 μl.

Pracovní podmínky pro AJS-ESI a hmotnostní spektrometr byly nastaveny tak, že teplota plynu dosahovala 290 °C, průtok plynu byl 8 l/min, tlak nebulizéru 206,8 kPa, napětí kapiláry 3,5 kV a napětí trysky bylo 2 kV. Celková doba analýzy byla nastavena na 4,5 minuty při tlaku okolo 401 barů.



Obrázek 6.7 Podmínky LC-MS/MS analýzy

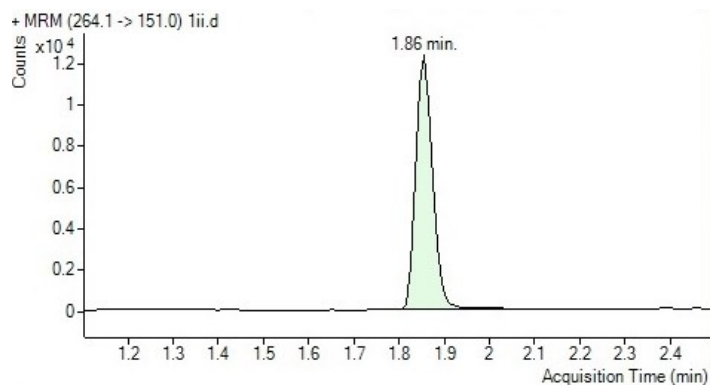
Vyhodnocení bylo prováděno pomocí softwaru MassHunter, verze A 00.08.24 (Agilent Technologies). Sběr dat probíhal v režimu MRM (Multiple reaction monitoring) s rychlostí měření jednoho bodu příslušného hmotnostního přechodu v rozmezí 5–200 ms na přechod.

Pro detekci vnitřního standardu (busulfan-d8), a busulfanu byly zvoleny MRM přechody uvedené v (viz Tabulka 6.6). Zvolené přechody byly následně ověřeny. Pro kvantifikaci busulfanu-d8 byl vybrán pouze kvantifikační přechod. Pro busulfan byl zvolen jeden kvantifikační dva konfirmační přechody.

Tabulka 6.6 Vybrané MRM přechody

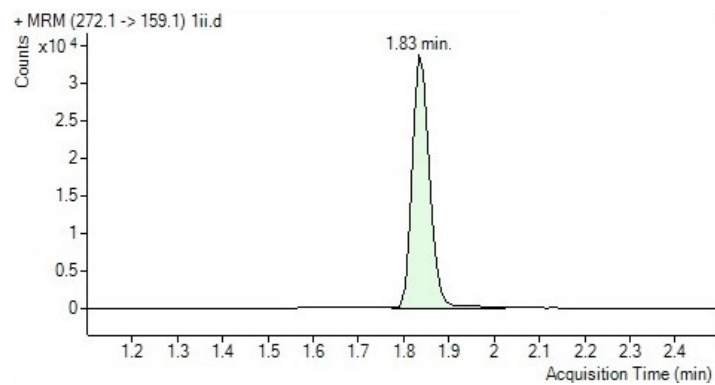
Sloučenina	Kvantifikační přechod [m/z]	Konfirmační přechod [m/z]
busulfan-d8	272,1 → 159,1	–
busulfan	264,1 → 151,0	264,1 → 247,2 264,1 → 55,2

Na Obrázku 6.8 je uveden chromatogram busulfanu a na Obrázku 6.9 chromatogram busulfanu-d8.



Obrázek 6.8 Chromatogram busulfanu

Z extrahovaného chromatogramu je patrné, že prekurzorový iont busulfanu měl hodnotu m/z 264,1 a jeho produktový iont o nejvyšší intenzitě byl o m/z 151,0. Retenční čas busulfanu je 1,86 minut.



Obrázek 6.9 Chromatogram busulfanu-d8

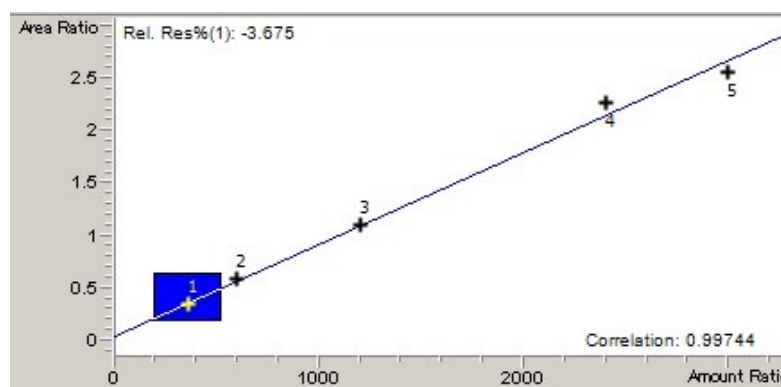
Pro busulfan-d8, jehož prekurzorový iont měl m/z rovno 272,1, byl vybrán fragment o m/z 159,1, protože intenzita tohoto fragmentu byla nejvyšší. Retenční čas busulfanu-d8 je 1,83 minut.

7. Výsledky a diskuze

7.1. HPLC – VALIDACE METODY

7.1.1. Kalibrace

Pro kvantifikaci busulfanu byla sestavena sedmi bodová lineární kalibrace, každý kalibrátor byl připraven v dubletu. Koncentrace jednotlivých kalibrátorů byly 0, 120, 360, 600, 1200, 2400, 3000 ng/ml. Pro výpočet koncentrace busulfanu byla použita rovnice regrese $y = 0,00087684 \cdot x + 0,0362418$, kde y je poměr plochy píku busulfanu a IS a x je koncentrace busulfanu. Hodnota regresního koeficientu pro busulfan je 0,99744. Ten nám udává míru rozptylu bodů od regresní křivky. Kalibrační křivka byla v celém rozsahu testovaných koncentrací lineární.



Obrázek 7.1 Kalibrační křivka busulfanu metodou HPLC

7.1.2. Opakovatelnost

Opakovatelnost vyjadřována jako přesnost metody, udává těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti měření. Podmínky opakovatelnosti měření zahrnují použití stejného postupu měření, stejným pracovníkem, na stejném místě za použití měření stejného analytu ve vzorcích téhož materiálu, stejným měřicím přístrojem, během krátkého časového intervalu [41]. Testování validačních parametrů opakovatelnosti jsem aplikovala na souboru měření patnácti kontrol pro nízkou, střední a vysokou hladinu busulfanu, které jsem připravovala a měřila v jeden den. Po analýze kontrol HPLC jsem z naměřených výsledků vypočítala průměr, výběrovou směrodatnou odchylku (SD), variační koeficient (CV) a míru správnosti neboli bias (vychýlení), (Tabulka 7.1). Směrodatná odchylka je ukazatelem míry přesnosti neboli míry rozptylu hodnot od střední hodnoty a měla by dosahovat nízkých hodnot. Variační koeficient vypovídá o nepřesnosti měření, a je definována jako podíl směrodatné odchylky a průměrné hodnoty měření, přičemž hodnota CV by neměla překročit hodnotu 10 %. Na základě získaných CV pro nízkou hladinu kontrol busulfanu, která dosáhla 4,17 %, pro střední hladinu 2,94 % a pro vysokou hladinu 3,22 %, lze stanovit, že jednotlivé hodnoty variačních koeficientů splňují podmínky pro úspěšnou validaci HPLC metody.

Tabulka 7.1 HPLC – Opakovatelnost busulfanu

č.	BUSULFAN		
	kontrola 1 [420 ng/ml]	kontrola 2 [1500 ng/ml]	kontrola 3 [3000 ng/ml]
1	425,23	1476,75	3023,02
2	429,78	1496,75	2941,18
3	417,04	1480,00	3048,87
4	393,25	1503,50	2998,16
5	430,95	1603,00	2988,15
6	424,58	1506,75	2934,69
7	390,13	1610,50	3032,26
8	397,02	1506,50	2882,99
9	436,93	1479,75	3069,33
10	437,19	1558,00	2901,91
11	390,78	1557,75	2814,57
12	412,62	1577,25	2711,94
13	395,17	1521,50	2933,59
14	415,23	1495,80	2954,80
15	402,36	1501,30	3011,20
průměr	413,22	1525,01	2949,78
SD	17,24	44,76	94,89
CV (%)	4,17	2,94	3,22
Bias (%)	-1,61	1,67	-1,67

7.1.3. Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost vyjadřována jako přesnost, udává těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek reprodukovatelnosti měření. Podmínka reprodukovatelnosti měření zahrnuje použití měření stejného analytu ve vzorcích téhož materiálu stejnou metodou, avšak zahrnuje nedodržení nejméně jedné z podmínek – místa měření, přístroje, obslužného personálu nebo času [41]. Reprodukovatelnost jsem testovala na sérii patnácti kontrol pro nízkou, střední a vysokou koncentrační hladinu busulfanu. Jednotlivé kontroly jsem připravovala a analyzovala v rozsahu patnácti dnů, tzn. kontrolu 1,2 a 3 jsem měřila každý den z důvodu splnění alespoň jedné z podmínek reprodukovatelnosti měření. Ostatní podmínky laboratorního měření byly zachovány. Z vyhodnocených výsledků kontrol jsem taktéž vypočítala průměr, výběrovou směrodatnou odchylku (SD), variační koeficient (CV) a míru správnosti neboli bias. Ze zjištěných hodnot CV pro busulfan (Tabulka 7.2), hodnotím validaci metody HPLC za úspěšně provedenou. Hodnoty CV dosáhly pro nízkou hladinu kontrol busulfanu 8,83 %, pro střední 5,13 % a pro vysokou 2,96 %, přičemž ani jedna z nich nepřekračuje mez 10 % CV.

Tabulka 7.2 HPLC – Reprodukovatelnost busulfanu

č.	BUSULFAN		
	kontrola 1 [420 ng/ml]	kontrola 2 [1500 ng/ml]	kontrola 3 [3000 ng/ml]
1	462,54	1719,50	2799,50
2	485,55	1700,75	2897,07
3	484,64	1595,75	2883,65
4	487,89	1545,50	2734,16
5	452,27	1633,25	2784,54
6	463,84	1520,48	2914,01
7	474,63	1487,00	2738,89
8	462,80	1491,50	2803,79
9	449,93	1671,50	2935,20
10	400,92	1620,75	3044,80
11	461,37	1456,00	2959,00
12	414,83	1594,80	2915,66
13	373,49	1609,25	2862,75
14	377,65	1557,30	2850,98
15	496,86	1498,50	2893,50
průměr	449,95	1580,12	2867,83
SD	39,72	81,06	84,88
CV (%)	8,83	5,13	2,96
Bias (%)	7,13	5,34	-4,41

7.1.4. Správnost (Bias)

Správnost neboli také pravdivost (skutečnost) udává rozdíl mezi střední hodnotou výsledků zkoušek (obvykle vyjádřený jako průměr) a přijatou referenční hodnotou. Míra správnosti je vychýlení (bias), který charakterizuje systematickou chybu měření, dosahuje kladných nebo záporných hodnot a neměl by přesáhnout hodnoty 10 % [41]. Z naměřených hodnot opakovatelnosti (Tabulka 7.1) a reprodukovatelnosti (Tabulka 7.2), jsem vypočítala hodnoty bias a žádná z těchto hodnot nepřekračuje hranici 10 %. Měření prokázala, že optimalizovaná metoda HPLC je správná pro stanovení busulfanu.

7.1.5. Mez detekce a mez kvantifikace

Mez detekce (LOD – Limit Of Detection) udává nejmenší hodnotu obsahu (koncentraci) analytu (složky) ve vzorku, pro kterou je analytický signál významně odlišný od šumu. Mez kvantifikace (LOQ – Limit Of Quantification) udává nejnižší koncentraci analytu, při které je přesnost a správnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní hodnocení [41]. Určení meze detekce a stanovitelnosti probíhalo na základě měření tří slepých vzorků (blanků), u nichž byly vyhodnoceny výšky píků šumu. Z vyhodnocených výšek píků jsem spočetla průměr, který jsem vynásobila třemi nebo desíti dle uvedených rovnic pro stanovení LOD a LOQ.

Pro výpočet LOD u chromatografických metod se používá rovnice:

$$\text{LOD} = Y_{d1} / b1 \quad (7.1)$$

kde LOD je mez detekce, Y_{d1} je 3x průměrná hodnota výšky šumu, $b1$ je směrnice v jednotkách, ve kterých je uváděn šum (výška píku) [41].

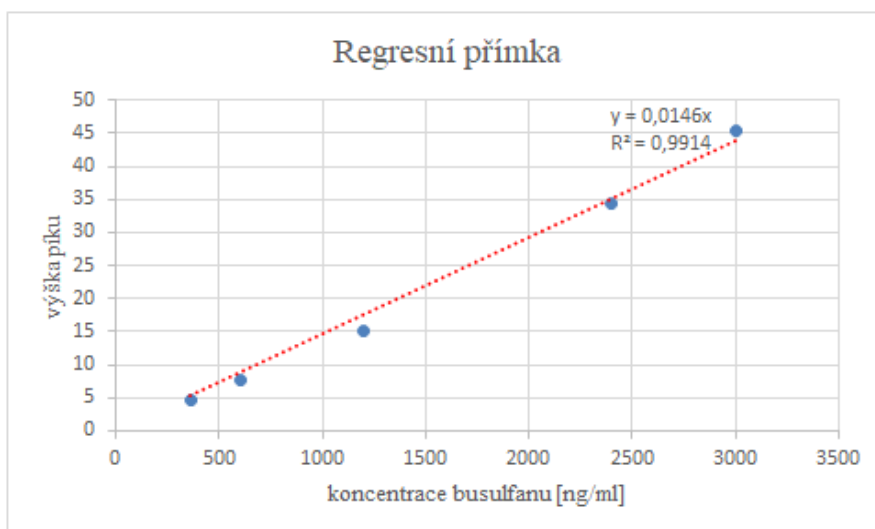
Pro výpočet LOQ u chromatografických metod se používá rovnice:

$$\text{LOQ} = Y_{d2} / b1 \quad (7.2)$$

kde LOQ je mez detekce, Y_{d2} je 10x průměrná hodnota výšky šumu, $b1$ je směrnice v jednotkách, ve kterých je uváděn šum (výška píku) [41].

Tabulka 7.3 Hodnoty výšek píků naměřených koncentrací

Koncentrace	Výška píku
360	4,6
600	7,6
1200	15,1
2400	34,5
3000	45,5



Graf 7.1 Regresní přímka závislosti výšky píku na koncentraci busulfanu

Z rovnice lineární regrese grafu závislosti výšky píku na koncentraci standardu jsem získala směrnici kalibrační přímky pro busulfan 0,0146.

Tabulka 7.4 Hodnoty výšek píků naměřených blanků

Blank	Výška píku
1	0,017
2	0,019
3	0,018
Průměr	0,018
Yd1	0,054
Yd2	0,18

Mez detekce pro určení busulfanu je 3,7 ng/ml a mez kvantifikace 12,3 ng/ml.

7.1.6. Výtěžnost

Výtěžnost metody udává poměr množství (koncentrační) analytu získaného analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě. Výtěžnost by se měla pohybovat v rozmezí 90–110 % [41]. Hodnoty výtěžnosti HPLC metody pro stanovení busulfanu pro koncentraci 420 ng/ml jsou 98,4–107,1 %, pro koncentraci 1500 ng/ml jsou pak 101,7–105,3 % a pro 3000 ng/ml 95,6–98,3 %. Naměřené hodnoty výtěžnosti jsou v rozmezí kritéria dané výtěžností a splňují podmínky úspěšné validace.

7.1.7. Robustnost

Robustnost metody udává míru kapacity metody poskytovat shodné výsledky při jejím reprodukování i za nepatrně změněných podmínek. Změna podmínek může nastat pro případ mezilaboratorních zkoušek (jiný přístroj, laboratoř, analytik) nebo změnou podmínek v jedné laboratoři (koncentrace, teplota, doba extrakce) [41]. Testování robustnosti bylo realizováno na základě změny teplotních podmínek při skladování vzorků v čase, ostatní faktory byly zachovány. K měření jsem použila deset patientských vzorků. Každý vzorek byl alikvotován na tři části a každá část byla skladována při jiné teplotě.

Pacientské vzorky jsem připravovala k měření dle postupu uvedeného v kapitole 6.1.4. Pacientské vzorky jsem změřila a jednotlivé alikvoty jsem hned umístila do lednice (cca 4 °C), mrazáku (cca –18 °C) a do hlubokomrazacího boxu (–70 °C). Vzorky skladované v lednici a v mrazáku jsem pak měřila v intervalu třech týdnů a to 7. den, 14. den a 21.den. Vzorky v hlubokomrazacím boxu jsem měřila v intervalu tří měsíců vždy 1.,2., a 3. měsíc od uskladnění. Z naměřených hodnot koncentrací každého patientského vzorku jsem vyhodnotila, o kolik procent se změnila koncentrace k původní hodnotě. Změny koncentrací patientských vzorků při různých teplotách jsou zaznamenány v následujících tabulkách (absolutní hodnoty):

Tabulka 7.5 HPLC – Naměřené koncentrace vzorků skladovaných v lednici

A – lednice (cca 4 °C)							
Vzorek	Naměřené koncentrace [ng/ml]				Změna koncentrace k původní hodnotě [%]		
	0.den	7.den	14.den	21.den	7.den	14.den	21.den
1	1303,60	987,22	796,12	698,34	24,27	38,93	46,43
2	1015,70	742,04	555,40	472,51	26,94	45,32	53,48
3	629,10	484,59	411,96	374,93	22,97	34,52	40,40
4	2272,50	1851,57	1470,16	1252,41	18,52	35,31	44,89
5	1169,70	899,88	758,88	623,4	23,07	35,12	46,70
6	759,70	535,21	490,68	456,33	29,55	35,41	39,93
7	714,51	564,38	462,76	435,28	21,01	35,23	39,08
8	1952,21	1468,1	1216,2	1186,9	24,80	37,70	39,20
9	1221,96	884,56	824,6	746,04	27,61	32,52	38,95
10	741,12	570,29	484,24	465,44	23,05	34,66	37,20
Průměr [%]	–	–	–	–	24,18	36,47	42,63

Tabulka 7.6 HPLC – Naměřené koncentrace vzorků skladovaných v mrazáku

B – mrazák (cca –18 °C)							
Vzorek	Naměřené koncentrace [ng/ml]				Změna koncentrace k původní hodnotě [%]		
	0.den	7.den	14.den	21.den	7.den	14.den	21.den
1	1303,60	1270,82	1167,23	1295,60	2,51	10,46	0,61
2	1015,70	886,60	875,50	946,46	12,71	13,80	6,82
3	629,10	543,01	595,75	469,30	13,68	5,30	25,40
4	2272,50	2173,76	1884,41	1965,39	4,35	17,08	13,51
5	1169,70	1131,43	961,39	976,87	3,27	17,81	16,49
6	759,70	725,19	695,07	647,22	4,54	8,51	14,81
7	714,51	678,91	717,09	643,87	4,98	0,36	9,89
8	1952,21	1823,2	1824,8	1758,9	6,61	6,53	9,90
9	1221,96	1254,58	1071,11	1064,92	2,67	12,34	12,85
10	741,12	702,55	729,57	653,21	5,20	1,56	11,86
Průměr [%]	–	–	–	–	5,52	9,30	12,21

Tabulka 7.7 HPLC –Naměřené koncentrace vzorků skladovaných v hlubokomrazicím boxu

C – hlubokomrazicí box (cca –70 °C)							
Vzorek	Naměřené koncentrace [ng/ml]				Změna koncentrace k původní hodnotě [%]		
	0.den	1.měsíc	2.měsíc	3.měsíc	1.měsíc	2.měsíc	3.měsíc
1	1303,60	1092,18	1146,175	1109,99	16,22	12,08	14,85
2	1015,70	791,82	853,675	752,77	22,04	15,95	25,89
3	629,10	581,98	542,805	535,80	7,49	13,72	14,83
4	2272,50	2037,71	1947,03	2029,96	10,33	14,32	10,67
5	1169,70	1110,42	1072,455	1088,09	5,07	8,31	6,98
6	759,70	640,23	679,63	650,23	15,73	10,54	14,41
7	714,51	650,03	632,415	604,83	9,03	11,49	15,35
8	1952,21	1823,4	1862,4	1715,20	6,60	4,60	12,14
9	1221,96	1179,17	1127,5	973,38	3,50	7,73	20,34
10	741,12	759,31	701,97	593,54	2,45	5,28	19,91
Průměr [%]	–	–	–	–	9,35	10,40	15,54

Z naměřených koncentrací vyplývá, že největší vliv na změnu koncentrace patientského vzorku mají skladovací podmínky, které se pohybují okolo 4 °C. Zde byl zaznamenán největší pokles koncentrací od původní hodnoty v rozsahu 24,18 % až 42,63 %. Z daných hodnot je také patrné, že busulfan je značně nestabilní při dlouhodobém skladování, a to především při vyšších teplotách.

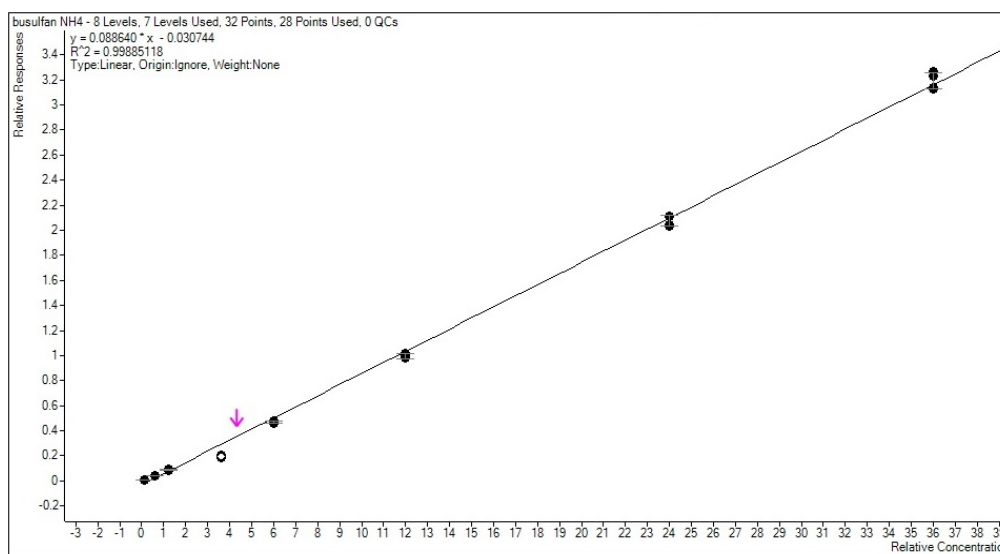
V porovnání s koncentracemi patientských vzorků uvedených v tabulkách 7.6 a 7.7 je zřejmé, že busulfan dosahuje největší stability při teplotě okolo –18 °C. Při této teplotě byly zaznamenány změny koncentrace k původní hodnotě v 7. dnu měření 5,52 %, 14. dnu 9,30 % a 21. dnu 12,21 %. Koncentrace uvedené v Tabulce 7.7 dosahovaly v 1. měsíci rozdílu oproti původní hodnotě průměrně o 9,35 %, v 2. měsíci o 10,40 % a v 3. měsíci o 15,54 %. Z uvedených hodnot plyne, že busulfan je vhodné skladovat dlouhodobě při teplotách okolo –70 °C a krátkodobě při –18 °C. Z těchto hodnot také vyplývá, že s narůstajícím časem skladování klesá i stabilita vzorku.

Z vyhodnocených dat všech validačních parametrů poskytuje vyvinutá metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie vyhovující analytické výsledky pro stanovení busulfanu v séru. Metoda HPLC byla prokazatelně úspěšně validována.

7.2. LC – MS/MS – VALIDACE METODY

7.2.1. Kalibrace

Pro kvantifikaci byla zvolena metoda kalibrační přímky (Graf 7.2). Ke stanovení busulfanu byla sestavena osmi bodová lineární kalibrace, každý kalibrátor byl připraven v dubletu. Koncentrace jednotlivých kalibrátorů byly 12, 60, 120, 360, 600, 1200, 2400 a 3600 ng/ml. Pro výpočet koncentrace busulfanu byla použita rovnice regrese $y = 0,088640 \cdot x - 0,030744$, kde y je poměr ploch píků busulfanu a IS a x je koncentrace busulfanu. Hodnota regresního koeficientu pro busulfan je 0,99885118, ta nám udává míru rozptylu bodů od regresní křivky. Kalibrační křivka byla v celém rozsahu testovaných koncentrací lineární.



Graf 7.2 Kalibrační křivka busulfanu pro metodu LC-MS/MS

7.2.2. Opakovatelnost

Testování validačních parametrů opakovatelnosti jsem realizovala na sérii měření deseti kontrol pro nízkou, střední a vysokou hladinu busulfanu. Vzorky kontrol jsem naměřila během jednoho dne a z výsledků jsem vypočítala průměr, výběrovou směrodatnou odchylku (SD), variační koeficient (CV) a míru správnosti neboli bias (viz Tabulka 7.8). CV pro nízkou hladinu kontrol busulfanu dosáhl 2,75 %, pro střední hladinu 2,64 % a pro vysokou hladinu 3,76 %. Jednotlivé hodnoty variačních koeficientů nepřesahují 10 %, a tudíž splňují předpoklady úspěšné validace metody.

Tabulka 7.8 LC-MS/MS – Opakovatelnost busulfanu

č.	BUSULFAN		
	kontrola 1 [420 ng/ml]	kontrola 2 [1500 ng/ml]	kontrola 3 [3000 ng/ml]
1	431,63	1478,24	2990,13
2	427,27	1462,56	2777,29
3	424,11	1459,84	2828,21
4	430,84	1482,91	2795,39
5	401,42	1417,22	2585,98
6	424,37	1365,58	2809,95
7	436,29	1451,86	2800,07
8	446,18	1403,81	2783,54
9	434,33	1444,34	2892,65
10	436,59	1403,93	2713,03
průměr	429,30	1437,03	2797,62
SD	11,80	37,93	105,28
CV (%)	2,75	2,64	3,76
Bias (%)	2,22	-4,20	-6,75

7.2.3. Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost jsem otestovala na sérii deseti kontrol pro nízkou, střední a vysokou hladinu busulfanu. Jednotlivé kontroly jsem měřila v intervalu několika dnů z důvodu splnění alespoň jedné z podmínek reprodukovatelnosti. Ostatní podmínky jako jsou použití jiného přístroje, místa měření, analytika byly nesplněny. Z naměřených vzorků kontrol jsem opět vypočítala průměr, výběrovou směrodatnou odchylku (SD), variační koeficient (CV) a míru správnosti neboli bias. Hodnota CV dosáhla pro nízkou hladinu kontrol busulfanu 3,71 %, pro střední 2,94 % a pro vysokou 4,92 %, přičemž žádná z nich nepřekračuje mez 10 %.

Tabulka 7.9 LC-MS/MS – Reprodukovatelnost busulfanu

č.	BUSULFAN		
	kontrola 1 [420 ng/ml]	kontrola 2 [1500 ng/ml]	kontrola 3 [3000 ng/ml]
1	456,32	1465,64	3065,03
2	420,85	1471,01	2837,80
3	418,95	1478,06	2845,10
4	422,23	1451,33	2782,90
5	406,15	1391,40	2511,71
6	423,60	1359,31	2819,66
7	438,58	1380,74	2832,04
8	450,96	1446,06	2762,87
9	431,69	1418,92	2915,18
10	445,45	1398,61	2765,25
průměr	431,48	1426,11	2813,75
SD	15,99	41,96	138,44
CV (%)	3,71	2,94	4,92
Bias (%)	2,73	-4,93	-6,21

7.2.4. Správnost (Bias)

Pro opakovatelnost a pro reprodukovatelnost metody LC-MS/MS jsem vypočítala hodnoty bias a žádná z těchto testovaných hodnot pro kontrolu o nízké, střední a vysoké hladině busulfanu nepřekračuje hranici 10 %. Hodnoty bias jsou uvedeny v tabulkách výše (viz Tabulka 7.8 a Tabulka 7.9).

7.2.5. Mez detekce a kvantifikace

Na základě FDA guideline (směrnice pro validaci bioanalytických metod) bylo stanovení meze detekce a limitu kvantifikace pro LC-MS/MS provedeno na základě nejnižšího bodu kalibrace [57], který je 1,2 ng/ml pro LOD a 12 ng/ml pro LOQ.

7.2.6. Výtěžnost

Hodnoty výtěžnosti LC-MS/MS metody pro stanovení busulfanu pro koncentraci 420 ng/ml jsou 102,2–102,7 %, pro koncentraci 1500 ng/ml jsou pak 95,1–95,8 % a pro 3000 ng/ml 93,3–93,8 %. Naměřené hodnoty výtěžnosti se pohybují v rozmezí 90–110 %, tudíž splňují podmínky úspěšné validace.

7.2.7. Robustnost

Testování robustnosti bylo realizováno na základě změny teplotních podmínek při skladování vzorků v čase, ostatní faktory byly zachovány. K měření jsem použila deset patientských vzorků, které jsem skladovala po dobu několika týdnů při třech různých teplotách.

Pacientské vzorky jsem připravovala k měření dle postupu uvedeného v kapitole 6.2.4. V případě první série deseti vzorků, jsem provedla měření týž den, a zbytek vzorků jsem umístila do lednice (cca 4 °C), mrazáku (cca -18 °C) a do hlubokomrazicího boxu (-70 °C). Vzorky skladované v lednici

a v mrazáku jsem pak měřila v intervalu třech týdnů a to 7. den, 14. den a 21.den. Vzorky v hlubokomrazicím boxu jsem měřila v intervalu tří měsíců vždy 1.,2., a 3. měsíc od uskladnění. Z naměřených hodnot koncentrací každého patientského vzorku jsem vyhodnotila, o kolik procent se změnila koncentrace k původní hodnotě. Změny koncentrací patientských vzorků při různých teplotách jsou zaznamenány v následujících tabulkách (absolutní hodnoty):

Tabulka 7.10 LC-MS/MS – Naměřené koncentrace vzorků skladovaných v lednici

A – lednice (cca 4 °C)							
Vzorek	Naměřené koncentrace [ng/ml]				Změna koncentrace k původní hodnotě [%]		
	0.den	7.den	14.den	21.den	7.den	14.den	21.den
1	473,60	378,96	318,60	269,01	19,98	32,73	43,20
2	1453,80	1210,86	944,27	775,11	16,71	35,05	46,68
3	801,60	694,32	538,29	399,92	13,38	32,85	50,11
4	489,00	397,05	299,41	257,38	18,80	38,77	47,37
5	2056,00	1534,67	1243,82	1054,19	25,36	39,50	48,73
6	1287,80	890,23	747,62	649,25	30,87	41,95	49,58
7	756,30	567,72	463,07	381,38	24,93	38,77	49,57
8	870,90	648,16	515,66	506,63	25,58	40,79	41,83
9	2062,00	1619,91	1135,12	1096,43	21,44	44,95	46,83
10	1303,60	987,22	796,12	698,34	24,27	38,93	46,43
Průměr [%]	–	–	–	–	22,13	38,43	47,03

Tabulka 7.11 LC-MS/MS – Naměřené koncentrace vzorků skladovaných v mrazáku

B – mrazák (cca –18 °C)							
Vzorek	Naměřené koncentrace [ng/ml]				Změna koncentrace k původní hodnotě [%]		
	0.den	7.den	14.den	21.den	7.den	14.den	21.den
1	473,60	481,52	446,32	480,39	1,67	5,76	1,43
2	1453,80	1346,10	1359,98	1267,46	7,41	6,45	12,82
3	801,60	762,33	739,44	726,45	4,90	7,76	9,38
4	489,00	453,93	463,19	481,35	7,17	5,28	1,57
5	2056,00	2049,72	1894,51	1930,65	0,31	7,85	6,10
6	1287,80	1308,65	1253,64	1174,88	1,62	2,65	8,77
7	756,30	777,63	763,43	708,15	2,82	0,94	6,37
8	870,90	890,36	781,16	736,90	2,23	10,30	15,39
9	2062,00	1801,43	1679,61	1816,86	12,64	18,54	11,89
10	1303,60	1295,60	1270,82	1167,23	0,61	2,51	10,46
Průměr [%]	–	–	–	–	2,47	6,62	8,13

Tabulka 7.12 LC-MS/MS – Naměřené koncentrace vzorků skladovaných v hlubokomrazícím boxu

C – hlubokomrazící box (cca –70 °C)							
Vzorek	Naměřené koncentrace [ng/ml]				Změna koncentrace k původní hodnotě [%]		
	0.den	1.měsíc	2.měsíc	3.měsíc	1.měsíc	2.měsíc	3.měsíc
1	473,60	467,37	478,30	458,19	1,32	0,99	3,25
2	1453,80	1327,49	1394,04	1277,90	8,69	4,11	12,10
3	801,60	810,04	717,59	820,11	1,05	10,48	2,31
4	489,00	478,35	451,69	469,57	2,18	7,63	3,97
5	2056,00	2119,05	2011,76	1935,78	3,07	2,15	5,85
6	1287,80	1276,2	1301,17	1293,38	0,90	1,04	0,43
7	756,30	732,83	760,54	691,71	3,10	0,56	8,54
8	870,90	788,99	768,18	752,85	9,41	11,79	13,56
9	2062,00	1757,935	1739,36	1526,01	14,75	15,65	25,99
10	1303,60	1146,175	1092,18	1109,99	12,08	16,22	14,85
Průměr [%]	–	–	–	–	4,83	6,54	8,54

Největší vliv skladovacích podmínek na změnu koncentrace patientských vzorků byl prokázán při skladování v lednici (viz Tabulka 7.10). Hodnoty koncentrace poklesly v porovnání s původními hodnotami průměrně 7. den měření o 22,13 %, 14. den měření o 38,43 % a 21. den měření o 47,03 %. Pro krátkodobé i dlouhodobé skladování vykazuje teplota okolo 4 °C nejméně příznivé výsledky pro stabilitu busulfanu.

V druhém případě testování vlivu skladovacích podmínek na patientské vzorky, skladování roztoků při cca –18 °C (viz Tabulka 7.11), byly zaznamenány změny koncentrací, jež dosahovaly 7. den průměrně 2,47 %, 14. den 6,62 % a 21. den 8,13 %. Z uvedených výsledků je patrné, že skladovací podmínky okolo –18 °C jsou optimální zejména pro krátkodobé skladování busulfanu.

Poslední případ analýzy dat robustnosti probíhal při teplotě skladování –70 °C. Naměřené koncentrace (viz Tabulka 7.12) dosahovaly rozdílu změn v průměru 4,83 % 1. měsíc, 6,54 % 2. měsíc a 8,54 % 3. měsíc měření. Z naměřených koncentrací vyplývá, že busulfan je možné skladovat dlouhodobě při teplotě –70 °C.

V případě porovnání s robustností HPLC je očividné, že naměřené koncentrace vzorků skladovaných v lednici, v mrazáku a v hlubokomrazícím boxu vychází vyšší než u LC-MS/MS. Tyto neočekávané rozdíly jsou způsobeny skladováním vzorku, které zřejmě ovlivňuje derivatizaci u HPLC metody.

Na základě vyhodnocení všech validačních požadavků, splňuje LC-MS/MS všechny parametry pro stanovení úspěšné validace metody.

7.3. Statistické porovnání metod HPLC a LC-MS/MS pro stanovení busulfanu měřením patientských vzorků

Pro statistické vyhodnocení naměřených dat HPLC a LC-MS/MS jsem použila programy Statistica 7 a MS Excel 2016.

7.3.1. Testovaný soubor patientských dat

Za účelem porovnání popsaných metod pro stanovení busulfanu jsem analyzovala vzorky séra od pediatrických pacientů s AML podstupujících kondicionální režim busulfanem ve FN Motol. Tyto vzorky jsem získala od Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol.

Obě metody jsem porovnávala na souboru 26 pediatrických pacientů, přičemž od každého pacienta bylo získáno 8 vzorků s výjimkou jednoho pacienta, od něhož byly získány pouze čtyři vzorky. Celkový soubor tedy obsahuje 204 vzorků séra.

Vzorky žilní krve byly pacientům odebrány druhý a třetí den od zahájení léčby busulfanem vždy v intervalu 0 (bezprostředně před pátou a devátou dávkou), 2, 4 a 6 hodin po dávce, přičemž dávky jsou pacientům podávány v šestihodinových infuzích po dobu 4 dnů. Pacienti obdrží během těchto čtyřech dnů celkem 16 dávek. Vzorky plné krve byly odebrány do zkumavek s akcelerátorem srážení, sérum bylo separováno a zmrazeno při cca -20°C do analýzy.

7.3.2. Výsledky HPLC a LC-MS/MS

Pro stanovení busulfanu v séru jsem patientské vzorky měřila metodami HPLC a LC-MS/MS. Z naměřených hodnot (koncentrací) z druhého a třetího dne jsem dále u každého pacienta vypočetla pomocí programu MW PHARM verze 4.0 (firma Mediware) hodnotu AUC. Tato ověřená platforma je využívána ve FN Motol pro TDM busulfanu, přičemž cílová plazmatická koncentrace busulfanu by se měla pohybovat v rozmezí 5000–7000 ng/ml.

Naměřené koncentrace busulfanu metodou HPLC a LC-MS/MS a vypočítané AUC jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 7.13).

Tabulka 7.13 HPLC a LC-MS/MS – naměřené koncentrace busulfanu a vypočítané AUC

Popisné údaje		HPLC	LC-MS/MS	HPLC	LC-MS/MS
Pacient	Den/hod	Koncentrace busulfanu [ng/ml]	Koncentrace busulfanu [ng/ml]	AUC [ng/h.ml]	AUC [ng/h.ml]
1	2/2	571,9	543,2	5287,9	6005,3
	2/4	1253,8	1418,6		
	2/6	840,4	971,2		
	2/8	527,6	682,5		
1	3/2	773,2	861,5	8105,8	8274,9
	3/4	1896,3	1909,2		
	3/6	1432,2	1387,3		
	3/8	675,6	820,4		
2	2/2	320,2	341,8	3255,4	3741,1
	2/4	894,2	985,5		
	2/6	470,4	551,6		
	2/8	206,0	325,1		
2	3/2	497,1	495,8	6467,1	6674,5
	3/4	1837,7	1929,2		
	3/6	931,0	908,8		
	3/8	432,6	502,7		
3	2/2	518,1	458,3	5295,3	5318,2
	2/4	1352,4	1313,8		
	2/6	761,7	839,9		
	2/8	549,0	552,5		
3	3/2	462,3	539,4	6280,6	6491,8
	3/4	1463,3	1569,8		
	3/6	1053,4	1056,4		
	3/8	784,9	700,0		
4	2/2	746,5	789,7	7367,6	7217,5
	2/4	1623,5	1529,3		
	2/6	1285,0	1233,0		
	2/8	804,1	903,2		
4	3/2	752,7	735,3	7203,4	6817,7
	3/4	1764,1	1443,7		
	3/6	1067,6	1183,4		
	3/8	787,3	828,2		
5	2/2	671,2	376,9	5907,0	4913,6
	2/4	1429,7	1198,1		
	2/6	914,8	745,7		
	2/8	546,8	649,1		
5	3/2	769,9	450,5	7865,5	5590,4
	3/4	1961,6	1401,8		
	3/6	1359,8	898,7		
	3/8	452,8	538,9		
6	2/2	467,1	558,4	4897,9	6820,7
	2/4	1190,0	1722,0		
	2/6	784,7	1067,2		
	2/8	481,4	683,9		
6	3/2	896,5	946,5	9848,8	10540,4
	3/4	2324,0	2603,7		
	3/6	1656,4	1636,1		
	3/8	991,5	1114,4		

Popisné údaje		HPLC	LC-MS/MS	HPLC	LC-MS/MS
Pacient	Den/hod	Koncentrace busulfanu [ng/ml]	Koncentrace busulfanu [ng/ml]	AUC [ng/h.ml]	AUC [ng/h.ml]
7	2/2	407,7	227,9	4553,4	4206,8
	2/4	1241,9	1152,1		
	2/6	677,9	663,9		
	2/8	306,1	346,9		
7	3/2	555,5	477,7	6431,0	5763,6
	3/4	1697,8	1398,9		
	3/6	1008,3	829,3		
	3/8	463,3	829,3		
8	2/2	324,3	348,3	4313,8	4608,7
	2/4	1295,3	1316,9		
	2/6	605,6	663,2		
	2/8	187,7	300,2		
8	3/2	443,7	564,4	6279,2	7838,1
	3/4	1899,4	2184,6		
	3/6	820,6	1152,6		
	3/8	395,5	599,3		
9	2/2	207,2	341,9	4283,2	5170,0
	2/4	1408,7	1622,9		
	2/6	527,7	634,9		
	2/8	203,2	312,8		
9	3/2	255,4	467,6	4982,6	6067,6
	3/4	1431,5	1712,8		
	3/6	821,7	894,1		
	3/8	220,8	386,1		
10	2/2	443,6	408,6	7202,0	6018,8
	2/4	2117,1	1713,1		
	2/6	1014,6	869,8		
	2/8	495,0	444,5		
10	3/2	749,4	506,6	7661,7	6816,1
	3/4	2216,3	1894,7		
	3/6	980,0	998,0		
	3/8	519,7	524,1		
11	2/2	542,7	452,0	7090,2	5651,9
	2/4	2085,0	1616,3		
	2/6	967,9	804,2		
	2/8	441,7	358,7		
11	3/2	590,4	488,1	7341,8	5918,1
	3/4	2028,0	1603,4		
	3/6	1060,0	884,9		
	3/8	575,4	453,4		
12	2/2	625,9	407,7	12586,4	10761,5
	2/4	4707,0	4317,0		
	2/6	1020,0	642,4		
	2/8	506,5	434,9		
12	3/2	611,4	551,9	6586,6	5534,6
	3/4	1653,6	1386,7		
	3/6	971,0	814,8		
	3/8	726,0	579,8		

Popisné údaje		HPLC	LC-MS/MS	HPLC	LC-MS/MS
Pacient	Den/hod	Koncentrace busulfanu [ng/ml]	Koncentrace busulfanu [ng/ml]	AUC [ng/h.ml]	AUC [ng/h.ml]
13	2/2	997,3	675,2	8119,6	5973,2
	2/4	2106,0	1556,4		
	2/6	1033,4	775,4		
	2/8	843,5	634,4		
13	3/2	976,0	573,4	6077,0	4236,2
	3/4	1544,6	1096,6		
	3/6	706,8	488,4		
	3/8	598,2	492,9		
14	2/2	305,6	219,0	6071,5	4616,4
	2/4	1696,6	1355,2		
	2/6	939,9	668,8		
	2/8	492,9	349,3		
14	3/2	631,4	530,6	8624,5	6865,3
	3/4	2265,7	1736,9		
	3/6	1388,0	1154,8		
	3/8	685,7	551,3		
15	2/2	781,0	592,7	8232,9	6230,9
	2/4	2056,6	1573,3		
	2/6	1322,7	959,5		
	2/8	693,3	572,7		
15	3/2	757,2	713,3	7911,8	5674,4
	3/4	1972,5	1448,2		
	3/6	1221,7	775,8		
	3/8	766,2	513,1		
16	2/2	792,9	649,7	8050,5	8018,5
	2/4	1986,0	2419,4		
	2/6	1234,6	927,8		
	2/8	816,4	674,4		
16	3/2	977,8	1204,2	10733,5	9431,5
	3/4	2352,5	2200,1		
	3/6	1996,1	1416,4		
	3/8	1058,5	994,4		
17	2/2	558,7	498,1	8187,2	6617,9
	2/4	2359,4	2027,9		
	2/6	1244,6	886,3		
	2/8	420,5	291,3		
17	3/2	624,9	617,1	7481,0	7542,5
	3/4	2189,6	1680,9		
	3/6	930,1	1386,2		
	3/8	616,7	791,3		
18	2/2	1245,0	1104,7	12576,7	11215,2
	2/4	3173,5	2709,4		
	2/6	1840,2	1785,1		
	2/8	1304,3	1121,5		
18	3/2	1086,6	792,6	10182,8	8153,2
	3/4	2555,9	1922,4		
	3/6	1514,2	1366,9		
	3/8	956,0	782,0		

Popisné údaje		HPLC	LC-MS/MS	HPLC	LC-MS/MS
Pacient	Den/hod	Koncentrace busulfanu [ng/ml]	Koncentrace busulfanu [ng/ml]	AUC [ng/h.ml]	AUC [ng/h.ml]
19	2/2	462,7	473,6	6080,6	5473,4
	2/4	1547,0	1453,8		
	2/6	841,3	801,6		
	2/8	841,3	489,0		
19	3/2	537,6	785,5	6988,2	10259,8
	3/4	1845,9	2797,4		
	3/6	1066,1	1465,0		
	3/8	626,6	949,5		
20	2/2	791,7	670,0	9589,7	8113,9
	2/4	2185,5	2056,0		
	2/6	1761,7	1287,8		
	2/8	903,6	756,3		
20	3/2	1229,2	870,9	10130,8	8617,8
	3/4	2211,5	2062,0		
	3/6	1753,4	1303,6		
	3/8	971,8	1015,7		
21	2/2	557,7	629,1	9126,5	8273,2
	2/4	2482,6	2272,5		
	2/6	1463,0	1169,7		
	2/8	677,6	759,7		
21	3/2	725,4	714,5	7776,7	7804,0
	3/4	1967,0	1952,2		
	3/6	1206,1	1222,0		
	3/8	705,1	741,1		
22	2/2	537,6	712,5	6466,4	6719,8
	2/4	1754,6	1661,8		
	2/6	949,4	1056,6		
	2/8	520,8	570,5		
23	2/2	677,9	639,7	8938,0	7664,2
	2/4	2365,6	1993,0		
	2/6	1381,8	1178,3		
	2/8	765,3	681,9		
23	3/2	796,4	793,7	8577,1	8155,8
	3/4	2164,5	1994,4		
	3/6	1336,6	1292,7		
	3/8	778,5	787,9		
24	2/2	373,7	408,6	5177,9	4491,0
	2/4	1332,1	1068,8		
	2/6	800,8	722,5		
	2/8	538,4	499,8		
24	3/2	467,7	466,1	5568,0	4767,6
	3/4	1485,5	1123,4		
	3/6	874,3	769,9		
	3/8	380,7	514,9		

Popisné údaje		HPLC	LC-MS/MS	HPLC	LC-MS/MS
Pacient	Den/hod	Koncentrace busulfanu [ng/ml]	Koncentrace busulfanu [ng/ml]	AUC [ng/h.ml]	AUC [ng/h.ml]
25	2/2	453,7	495,5	6528,7	5273,5
	2/4	1847,8	1399,9		
	2/6	908,5	722,2		
	2/8	562,4	533,8		
25	3/2	532,3	605,8	7507,2	6667,9
	3/4	2087,9	1692,1		
	3/6	1108,3	1018,2		
	3/8	582,5	641,5		
26	2/2	600,6	646,2	9337,8	7556,9
	2/4	2760,8	2063,7		
	2/6	1274,6	1040,5		
	2/8	666,4	702,3		
26	3/2	555,2	602,4	7413,5	6692,5
	3/4	1799,7	1644,1		
	3/6	1310,2	1041,9		
	3/8	638,5	718,1		

Z naměřených koncentrací busulfanu metodou HPLC a LC-MS/MS uvedených v tabulce (Tabulka 7.13) je patrné, že v případě měření HPLC byly naměřené koncentrace v porovnání s naměřenými koncentracemi LC-MS/MS z 89, 2 % vyšších a 10,8 % bylo nižších.

Z vypočítaných hodnot AUC vyplývá, že v případě měření metodou HPLC převyšovalo 56,9 % stanovené rozmezí AUC, 31,4 % se nacházelo v terapeutickém okně a nebylo by tak nutné dávku pacientům upravovat a 11,8 % bylo nižší. V případě měření metodou LC-MS/MS bylo z celkového počtu vypočítaných hladin plazmatických koncentrací 35,3 % vyšších než cílové rozmezí, 60,8 % bylo v normě a 15,7 % bylo nižších. Z hodnot, které se nachází mimo terapeutické rozmezí je zřejmá důležitost TDM busulfanu v plazmě a nutnost úpravy dávky daným pacientům.

Dále v Tabulka 7.13 jsou **žlutě** vyznačená pole, která u daných pacientů poukazují na významně odlišná stanovení AUC busulfanu vyplývajících z měření HPLC a LC-MS/MS, která by mohla vést k neadekvátní léčbě.

Například u pacienta č. 6 došlo k situaci, kdy z prvních odběrů a následné HPLC analýzy byla vyhodnocena AUC1 4897,9 ng/h/ml a z analýzy LC-MS/MS byla AUC1 6820,7 ng/h/ml. Z druhých odběrů byla z HPLC analýzy vypočtena AUC2 9848,8 ng/h.ml a z LC-MS/MS analýzy AUC2 10540,4 ng/h/ml. Z toho plyne, že lékař dle výsledků AUC1 HPLC dávku pacientovi navýšil, jelikož koncentrace busulfanu u tohoto pacienta nedosáhla terapeutického rozmezí a mohlo by tak dojít k relapsu štetu. Hodnoty získané pomocí LC-MS/MS v té době neměl lékař ještě k dispozici, protože metoda kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií byla zavedena až později. Kdyby byly výsledky z LC-MS/MS k dispozici, tak dle AUC, by se hladiny busulfanu u tohoto pacienta nacházely v terapeutickém rozmezí a lékař by je nemusel navyšovat. Navýšením dávky dle výsledků AUC2 došlo k předávkování pacienta díky navýšení dávky a vysoké intraindividuální variabilitě busulfanu a dávkování poté muselo být sníženo.

Další sporný případ je pacient č. 13. HPLC systémem byla u pacienta č. 13 z prvních odběrů druhého

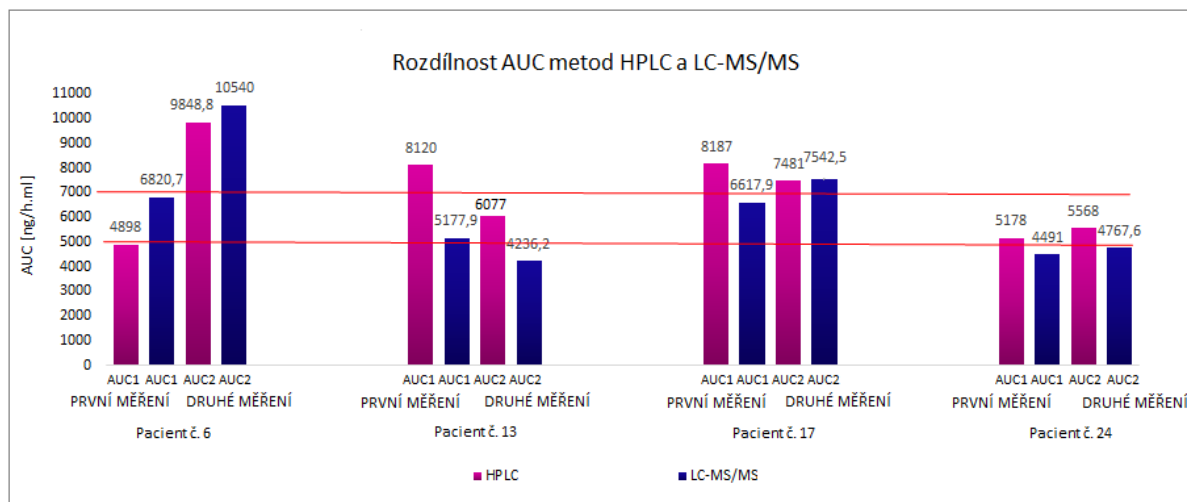
dne vyhodnocena AUC1 8119,6 ng/h/ml a LC-MS/MS 5573,2 ng/h/ml. Rozdílnost mezi plazmatickými hladinami léku naměřenými systémy je očividná, avšak lékař dle výsledků AUC1 HPLC, které mu byly v danou chvíli k dispozici, musel dávku pacientovi snížit z důvodů vyloučení rizika předávkování. Napříč tomu, dle výsledků AUC1 LC-MS/MS by byla terapeutická dávka pacientovi nezměněna. Druhé odběry z třetího dne však ukázaly, že podle výsledků HPLC AUC2 6077,0 ng/h/ml byla eliminována hrozba předávkování a bylo dosaženo léčebného terapeutického rozmezí, avšak z výsledků LC-MS/MS AUC2 4236,2 ng/h/ml by snížená dávka dle rozhodnutí z výsledků HPLC způsobila pod dávkování. Respektive dávka léku by nebyla pro pacienta dostatečně účinná a tím pádem by byla snížena pravděpodobnost uchycení štěpu a celkové přežití.

U pacienta č. 17 je zajímavé, že daná měření jsou rozdílná, ale ne s konstantní odchylkou, což ve výsledku nemělo vliv na hodnotu AUC, která u obou metod vyšla téměř shodná.

Jeden z dalších diskutabilních případů je také pacient č. 24, u něhož můžeme z prvních odběrů vypočítaného AUC1 5177,9 ng/h/ml pro metodu HPLC vyzorovat, že pacient se nacházel na spodní hranici terapeutického rozmezí AUC. Z důvodu rizika pod dávkování pacienta a hrozby relapsu štěpu mu byla dávka nepatrně navýšena. Pacientova AUC2 z druhého odběru byla 5568,0 ng/h/ml. V porovnání s výsledky analýzy LC-MS/MS byla AUC1 oproti HPLC analýzy stanovena nižší 4491,0 ng/h/ml a v případě navýšení dávky pro stanovení HPLC, by byl pacient i tak pod dávkovaný a hrozil by relaps štěpu. Jeho výsledné AUC2 tak bylo 4767,6 ng/h/ml.

Z uvedených případů vyplývá, že rozdílnost mezi vyhodnocenými výsledky AUC pro daného pacienta systém HPLC a LC/MS-MS je vysoce individuální, a pokud by měl lékař současně k dispozici oba výsledky, bylo by značně komplikované se rozhodnout, zdali má být pacientovi dávka ponechána, snížena či navýšena. Nicméně ze souhrnného porovnání obou systémů viz. výše plyne, že 60,8 % pacientů, by dle výsledků LC-MS/MS dosahovalo správného léčebného terapeutického rozmezí a dle výsledků HPLC pouze 31,4 % pacientů.

Graf (viz Obrázek 7.2) zobrazuje rozdílnost mezi vyhodnocenými AUC HPLC a LC-MS/MS konkrétně pro zmiňované čtyři pacienty. Červené přímkové v grafu znázorňují cílové rozmezí AUC tj. 5000–7000 ng/h.ml.



Obrázek 7.2 Rozdílnost AUC metod HPLC a LC-MS/MS

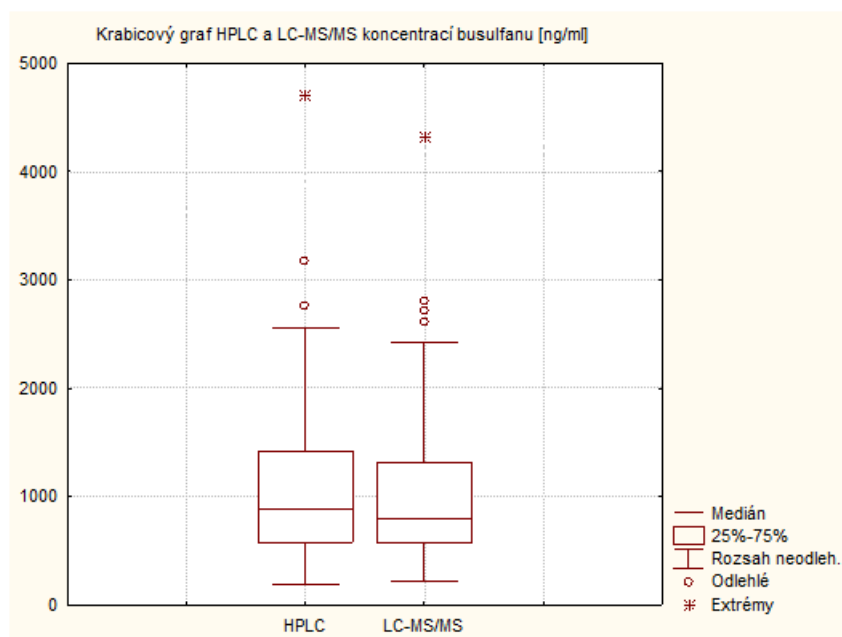
Tabulka 7.14 shrnuje výsledky výběrové statistické charakteristiky měření koncentrací busulfanu HPLC a LC-MS/MS testovaného souboru pacientů. Z uvedených výsledků lze pozorovat, že mediány koncentrací naměřených HPLC a LC-MS/MS jsou rozdílné, liší se o 81,4 ng/ml, kde medián koncentrací naměřených HPLC je 884,3 ng/ml a LC-MS/MS je 802,9 ng/ml. V průměru se hodnoty jednotlivých koncentrací naměřených HPLC a LC-MS/MS od sebe liší přibližně o 79,9 ng/ml, přičemž průměrná hodnota koncentrací stanovených HPLC je 1074,7 ng/ml a LC-MS/MS 994,8 ng/ml. Směrodatná odchylka, jež je vztažena ku průměrným hodnotám koncentrací busulfanu vyplývajících z měření HPLC a LC-MS/MS je u metody HPLC 654,5 ng/ml a u LC-MS/MS 582,1 ng/ml. Z hodnot popisné výběrové statistiky souboru koncentrací busulfanu naměřených metodou HPLC a LC-MS/MS vyplývá, že stanovené hodnoty koncentrací busulfanu HPLC v porovnání s metodou LC-MS/MS jsou podstatně vyšší, a dle minima taktéž i rozsah koncentrací busulfanu HPLC je větší.

Tabulka 7.14 Popisné výběrové statistiky koncentrací busulfanu naměřených metodou HPLC a LC-MS/MS

Statistický parametr	HPLC	LC-MS/MS
	Koncentrace [ng/ml]	Koncentrace [ng/ml]
Minimum	187,7	219,0
Maximum	4707,0	4317,0
Medián	884,3	802,9
25 %	578,9	564,4
75 %	1419,2	1315,4
Průměr	1074,7	994,8
Směrodatná odchylka	654,5	582,1

Při zobrazení krabicových diagramů reprezentujících koncentrace busulfanu příslušných měření HPLC a LC-MS/MS, se u obou metod vyskytly tzv. odlehlá pozorování a extrémní hodnoty (Graf 7.3). U obou případů se však nejedná o hodnoty, které by vyjadřovaly chyby měření a zkreslovaly by statistické výsledky. Hodnoty naměřených koncentrací metodou HPLC a LC-MS/MS představují vysoké koncentrace busulfanu čili předávkování pacienta. Z tohoto důvodu nebyly tyto hodnoty před dalším statistickým zpracováním odstraněny.

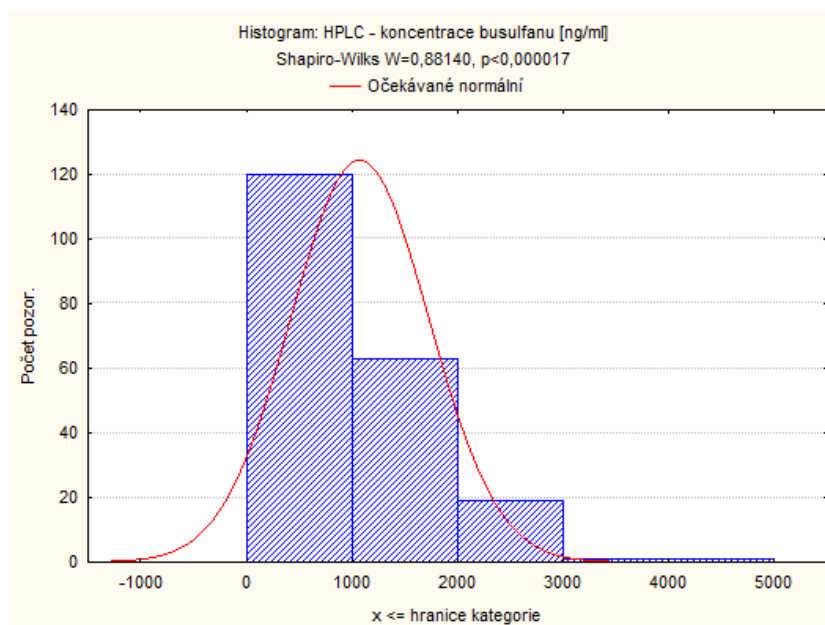
Spodní vodorovné čáry krabicových grafů vyznačují minimální koncentrace naměřené metodou HPLC a LC-MS/MS, naopak horní vodorovné čáry představují koncentrace maximální. Spodní část krabice dolní kvartil, horní část horní kvartil a vodorovná čára medián. Z tohoto grafu je na první pohled zřejmé, nejen že koncentrace naměřené metodou HPLC se pohybují níže než koncentrace naměřené metodou LC-MS/MS, ale jde vidět i to, že maximální koncentrace metody LC-MS/MS jsou nižší než medián koncentrací stanovených HPLC metodou. Soubor dat prokazuje určitou nesymetrii, která vyplývá z mediánu koncentrací obou metod. Oba mediány jsou posunuty směrem k dolnímu kvartilu, jedná se tedy o soubory s kladným zešikmením dat.



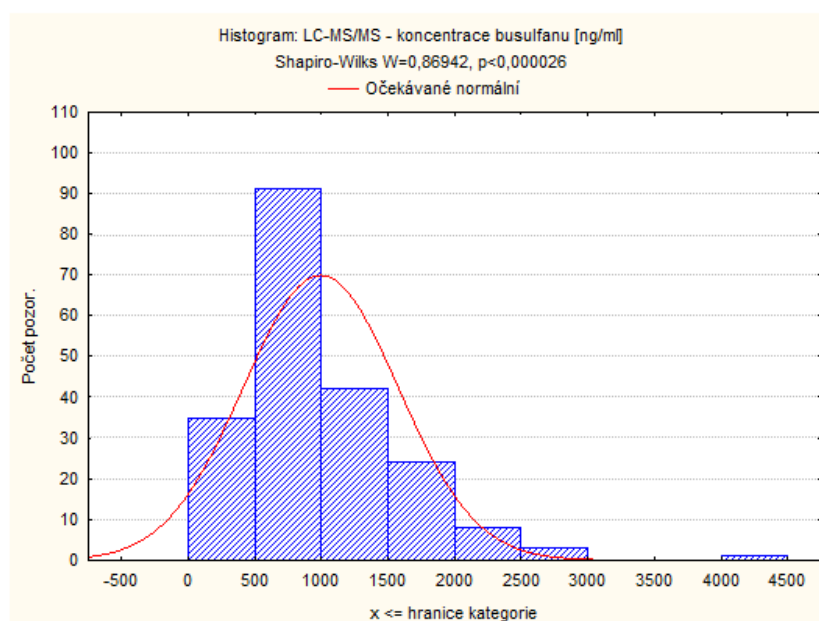
Graf 7.3 Krabicové grafy koncentrací busulfanu naměřených HPLC a LC-MS/MS

Pro ověření normality dat pro metodu HPLC a LC-MS/MS jsem použila Shapiro-Wilkův test normality a vykreslení histogramů dat. Data histogramů jsem porovnávala s teoretickou hustotou pravděpodobnosti. V obou případech jsou hodnoty Shapiro-Wilkova testu $p < 0,05$. Z tohoto důvodu je potřeba zamítnout nulovou hypotézu H_0 a přijmout hypotézu alternativní H_A . To znamená, že mezi normálním rozdělením a rozdělením naměřených dat je statisticky významný rozdíl. Data nemají normální rozdělení a z této příčiny je nutné pro následující zpracování naměřených dat aplikovat neparametrické statistické testy.

Graf 7.3 a Graf 7.4 znázorňují histogramy testovaného souboru patientských koncentrací busulfanu naměřených metodou HPLC a LC-MS/MS ve srovnání s předpokládaným normálním rozdělením. Nad grafy jednotlivých histogramů je uvedena vypočítaná p hodnota Shapiro-Wilkova testu normality a také hodnota W testové statistiky.



Graf 7.4 Histogram testovaného souboru koncentrací busulfanu naměřených HPLC



Graf 7.5 Histogram testovaného souboru koncentrací busulfanu naměřených LC-MS/MS

Histogramy u obou metod znázorňují pravostranné rozdělení dat čili rozložení s kladnou šikmostí a nasvědčují tomu, že data u obou metod jsou nesymetrická a nepocházejí z normálního rozdělení.

Testování hypotéz, zda naměřené koncentrace metodou HPLC a LC-MS/MS se od sebe liší, jsem učinila pomocí Wilcoxonova párového testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Nulová hypotéza H_0 vypovídá o případě, ve kterém se výběry od sebe neliší (medián rozdílů je nulový) tzn., že mezi porovnávanými metodami není statisticky významný rozdíl. Alternativní hypotéza H_A naopak vypovídá o případě, kdy výběry se od sebe liší (medián rozdílů je různý od nuly) tedy, že mezi porovnávanými metodami je statisticky významný rozdíl. H_A bude přijata v případě, že hodnota $p < 0,05$.

V Tabulka 7.15 je zobrazena hodnota počtu platných proměnných, testové statistiky T a úroveň p (hodnota p). Z tabulky je patrné, že je hodnota proměnné $p < 0,05$, proto je nutné zamítnout nulovou hypotézu H_0 a přijmout hypotézu alternativní H_1 .

Tabulka 7.15 Wilcoxonův párový test – porovnání metod HPLC a LC-MS/MS dle koncentrací busulfanu

Dvojice proměnných	Wilcoxonův párový test Označené testy jsou významné na hladině $p < 0,05$		
	Počet platných	T	Úroveň p
HPLC [ng/ml] & LC-MS/MS [ng/ml]	204	6431,50	0,000002

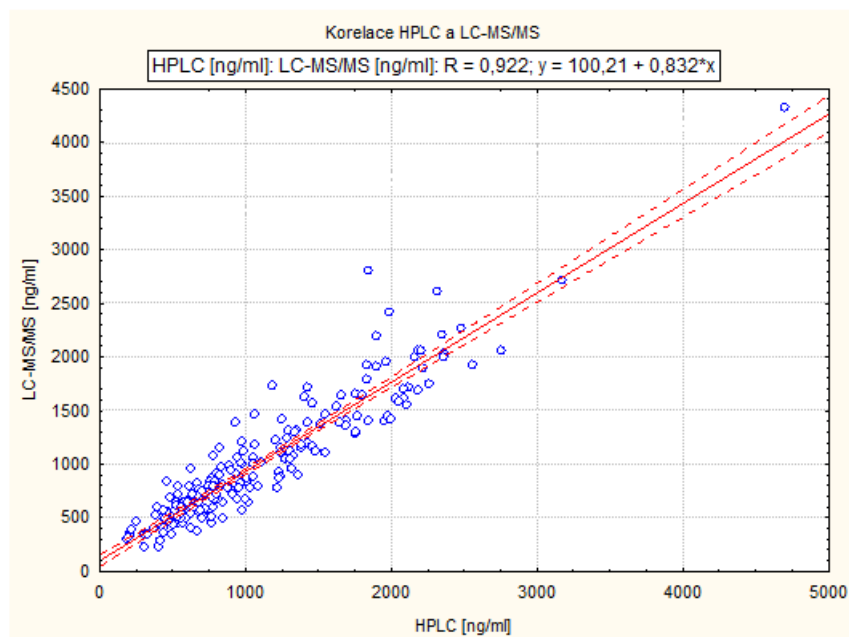
Z toho plyne, že metoda HPLC a LC-MS/MS vykazují statisticky významný rozdíl naměřených koncentrací.

K posouzení intenzity (síly) závislosti mezi naměřenými hodnotami koncentrací HPLC a LC-MS/MS jsem použila Spearmanův korelační koeficient. Koeficient nabývá hodnot od -1 do 1 , kdy znaménko určuje směr závislosti a intenzita korelace je vyjádřena samotnou hodnotou korelačního koeficientu. Hodnota Spearmanova korelační koeficientu je uvedena v Tabulce 7.16.

Tabulka 7.16 Spearmanův korelační koeficient HPLC a LC-MS/MS

Proměnná	Spearmanův korelační koeficient
	LC-MS/MS [ng /ml]
HPLC [ng/ml]	0,921956

Z regresní analýzy grafu (Graf 7.6) je patrná závislost mezi daty naměřenými metodou HPLC a LC-MS/MS. Mezi metodami HPLC a LC-MS/MS existuje relativně silná pozitivní lineární závislost, která je vyjádřena Spearmanovým korelačním koeficientem. Zjištěná závislost není dokonalá, avšak ve většině případech jsou naměřené koncentrace metodami HPLC a LC-MS/MS koncentrovány kolem regresní přímky. V horní části grafu je uvedena regresní rovnice y a Spearmanův korelační koeficient R .



Graf 7.6 Regresní analýza korelace metod HPLC a LC-MS/MS

Výsledky výběrové statistické charakteristiky uvedené v tabulce (Tabulka 7.17) reprezentují vyhodnocené AUC pro systémy HPLC a LC-MS/MS u testovaného souboru pacientů. Z tabulky lze vyčíst, že medián AUC HPLC je 7341,8 ng/ml a vypovídá o tom, že „alespoň“ polovina vyhodnocených AUC HPLC bylo 7341,8 ng/h/ml. To znamená, že minimálně polovina pacientů z testovaného souboru byla z vyhodnocených koncentrací HPLC předávkována. Medián AUC LC-MS/MS je 6667,9 ng/h/ml tzn., že „alespoň“ polovina vyhodnocených AUC LC-MS/MS bylo 6667,9 ng/h/ml, respektive minimálně polovina pacientů z testovaného souboru se nacházelo z vyhodnocených koncentrací LC-MS/MS v terapeutickém rozmezí. V průměru se hodnoty AUC HPLC a AUC LC-MS/MS od sebe liší o 601,6 ng/h/ml, z toho vyplývají vysoké hodnoty směrodatných odchylek AUC obou metod HPLC a LC-MS/MS signalizující velké vzájemné odlišnosti mezi typickými případy v souboru zkoumaných čísel AUC HPLC a AUC LC-MS/MS.

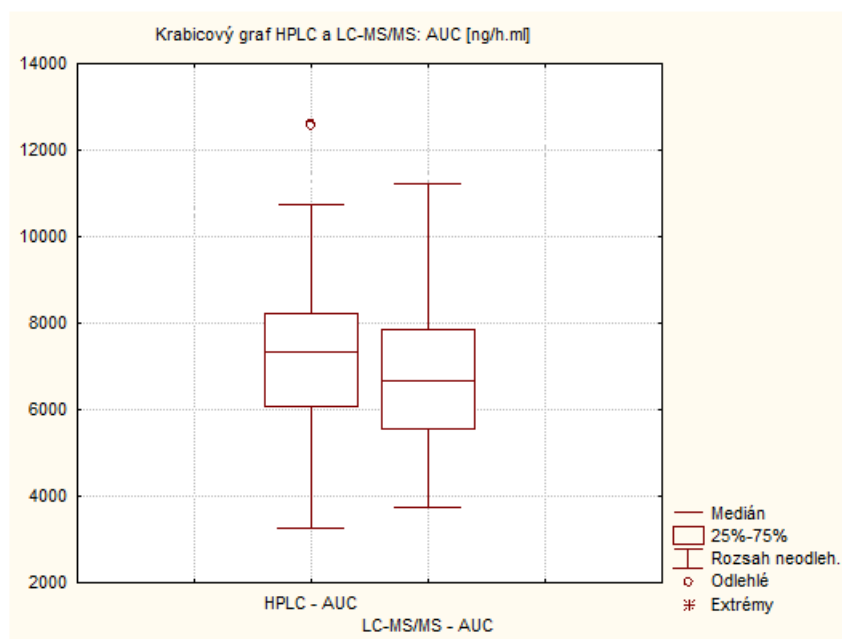
Tabulka 7.17 Popisné výběrové statistiky AUC naměřených metodou HPLC a LC-MS/MS

Statistický parametr	HPLC	LC-MS/MS
	AUC [ng/ml]	AUC [ng/ml]
Minimum	3255,4	3741,1
Maximum	12586,4	11215,2
Medián	7341,8	6667,9
25 %	6077,0	5534,6
75 %	8232,9	7838,1
Průměr	7344,1	6742,5
Směrodatná odchylka	1971,5	1739,1

Pro posouzení symetrie, variability a existenci odlehlých či extrémních hodnot datového souboru AUC HPLC a LC-MS/MS byly taktéž zkonstruovány krabicové diagramy (Graf 7.7). Z krabicového grafu AUC HPLC bylo vyšetřeno jedno odlehlé pozorování. Stejně tak jako u datového souboru koncentrací

busulfanu příslušných měření HPLC a LC-MS/MS nebude tato hodnota pro další statistické zpracování odstraněna z důvodu toho, že i v tomto případě se jedná o předávkovaného pacienta u něhož byla zaznamenána vysoká hladina plazmatické koncentrace busulfanu.

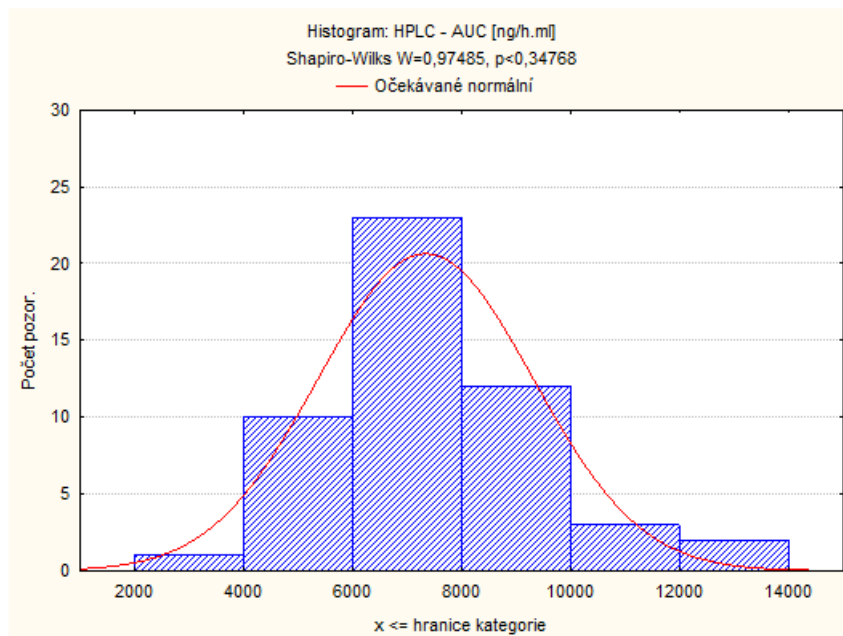
Z grafu lze vyčíst, že medián AUC HPLC je mírně posunutý k hornímu kvartilu a medián AUC LC-MS/MS se nachází uprostřed spodního a horního kvartilu, z toho vyplývá, že oba soubory dat by neměly být záporně ani kladně zešikmené.



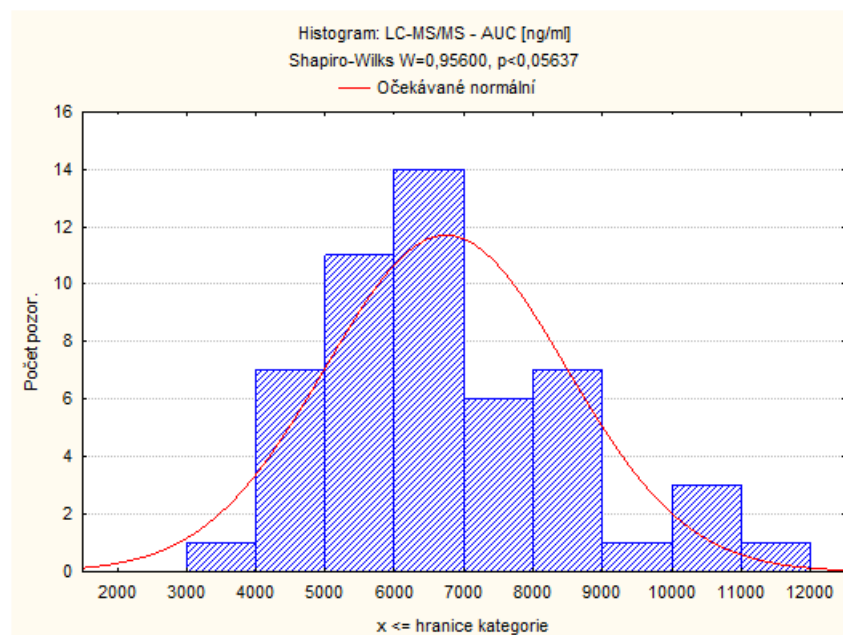
Graf 7.7 Krabicové grafy AUC HPLC a LC-MS/MS

Normalitu datového souboru AUC vyplývajících z měření HPLC a LC-MS/MS jsem taktéž otestovala pomocí Shapirova-Wilkova testu. Nad grafy histogramů (viz Graf 7.8 a Graf 7.9) je vypočítána hodnota p Shapirova-Wilkova testu a hodnota testové statistiky W . U obou případů jsou hodnoty Shapirova-Wilkova testu $p > 0,05$, proto je nutné zamítnout alternativní hypotézu H_A a přijmout hypotézu nulovou H_0 . Z toho plyne, že mezi normálním rozdělením a rozdělením naměřených dat není statisticky významný rozdíl. Data mají normální rozdělení a pro další analýzu dat je potřeba použít parametrické statistické metody.

Následující histogramy dat zobrazují rozložení hodnot AUC pro HPLC a LC-MS/MS v porovnání s očekávaným normálním rozložením.



Graf 7.8 Histogram testovaného souboru AUC stanovených z měření HPLC



Graf 7.9 Histogram testovaného souboru AUC stanovených z měření LC-MS/MS

Histogramy dat u obou metod znázorňují normální rozložení a nasvědčují tomu, že data u obou metod pocházejí z normálního rozdělení.

Testování hypotéz, zda vyhodnocená AUC metodou HPLC a LC-MS/MS se od sebe liší, jsem posoudila pomocí párového T-testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Nulová hypotéza H_0 představuje případ, v němž se výběry od sebe neliší (průměrné hodnoty obou proměnných jsou stejné) tedy, že mezi porovnávanými hodnotami AUC HPLC a AUC LC-MS/MS není statisticky významný rozdíl. Naopak alternativní hypotéza H_A představuje případ, ve kterém se výběry od sebe liší (průměrné

hodnoty obou proměnných nejsou stejné), mezi porovnávanými hodnotami AUC HPLC a AUC LC-MS/MS je statisticky významný rozdíl. Toto tvrzení bude přijato v případě, že hodnota $p < 0,05$.

V Tabulka 7.18 je zobrazena hodnota průměru, směrodatné odchylky, počtu platných proměnných, rozdílu, směrodatné odchylky rozdílu, testové statistiky T a úroveň p (hodnota p). Hodnota proměnné $p < 0,05$, proto zamítám nulovou hypotézu H_0 o rovnosti průměrných hodnot výběrů a přijímám hypotézu alternativní H_A .

Tabulka 7.18 Párový t-test – porovnání metod HPLC a LC-MS/MS dle AUC

Proměnná	t-test pro závislé vzorky Označ. rozdíly jsou významné na hlad. $p < 0,05$						
	Průměr	Sm.odch.	N	Rozdíl	Sm.odch. rozdílu	t	p
AUC - HPLC [ng/h.ml]	7344,12	1971,50					
AUC - LC-MS/MS [ng/h.ml]	6742,52	1739,11	51	601,60	1150,53	3,73	0,000483

7.3.3. Mezilaboratorní porovnání

Mezilaboratorní porovnání výsledků analytických metod (měřicích postupů) HPLC a LC-MS/MS bylo provedeno s laboratořemi ve Švýcarsku. Toho se Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol zúčastnil z důvodu neexistence externí kontroly v ČR.

Výsledky mezilaboratorního porovnání HPLC a LC jsou uvedeny v tabulkách (Tabulka 7.19 a Tabulka 7.20). Z uvedených výsledků byla prokázána rozdílnost měření u HPLC metody, která byla pravděpodobně způsobena nestejnou derivatizací busulfanu během přípravy vzorků. Pro metodu HPLC bylo mezilaboratorní porovnání provedeno v roce 2016 a na základě těchto vypovídajících faktů se Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol rozhodl přejít na jinou analytickou metodu, která by s větší přesností či s menšími výchyly měření kvantifikovala daný busulfan, konkrétně u pacientů podstupujících předpřípravný režim transplantace hematopoetických progenitorových buněk. Mezilaboratorní porovnání LC-MS/MS bylo provedeno v roce 2018.

Tabulka 7.19 Mezilaboratorní porovnání HPLC

Vzorek	Teoretická koncentrace [ng/ml]	Laboratoř České Republiky [ng/ml]	Rozdíl [%]
A	250	414	65,5
B	0	0	0
C	1500	1606	7,1
D	125	210	67,7
E	3250	4028	23,9
F	4000	3924	-1,9
G	325	510	56,9
H	750	975	30,0

Tabulka 7.20 Mezilaboratorní porovnání LC-MS/MS

Vzorek	Teoretická koncentrace [ng/ml]	Laboratoř České Republiky [ng/ml]	Rozdíl [%]
1	250	247,9	-0,8
2	1500	1449,8	-3,3
3	125	136,6	9,3
4	3250	3331,8	2,5
5	4000	4212,7	5,3
6	325	338,9	4,3
7	750	773,6	3,1

Z hlediska porovnání s metodami uvedenými v kapitole 5 dosahuje zavedená metoda LC-MS/MS kladných výsledků.

Například ve srovnání s autory Desire et al. naše metoda je nepatrně rychlejší. Ke kvantifikaci busulfanu v plazmě autoři použili LC-MS/MS s ionizací elektrosprejem ESI, vnitřní standard d8-busulfan a pro následnou detekci IS a busulfanu zvolili stejné MRM přechody (264,1 → 151,1 pro busulfan a 272,1 → 159,1 pro vnitřní standard), přičemž do systému bylo injektováno 10 µl vzorku a celková doba analýzy trvala 5 minut. Jejich retenční časy byly 1,24 minut a 1,23 minut. Naše vzorky byly do systému injektovány o objemu 1 µl, celková doba běhu v našem případě trvala 4,5 minuty a naše retenční časy byly 1,86 minut pro busulfan a 1,83 minut pro IS [55].

Také autoři Ansari et al. měřili busulfan metodou LC-MS/MS za použití stejného IS a s použitím stejných MRM přechodů, avšak chromatografickou separaci prováděli za použití jiné kolony a jiné gradientní mobilní fáze. Do systému však bylo injektováno 5 µl vzorku a celková doba analýzy byla 7 minut, přičemž retenční časy pro busulfan a IS byly 2,9 minut a 2,91 minut. V našem případě retenční časy byly 1,86 minut pro busulfan a 1,83 minut pro IS. Naše metoda i v tomto případě je výhodnější, protože doba analýzy je kratší [54]. Nejrychlejší analýzy docílili autoři Reis et al. taktéž pomocí LC-MS/MS ESI, avšak za použití jiné separační kolony, jiného vnitřního standardu a také i jiné mobilní fáze, která neprobíhala v režimu gradientním, ale izokratickým. Busulfan kvantifikovali za 3,5 minuty, jejich retenční časy pro busulfan a IS byly 1,81 minut a 2,65 minut, avšak do systému bylo vstříkováno až 40 µl vzorku, což by v našem případě znamenalo, že by pediatrickým pacientům muselo být odebráno větší množství séra, a proto ani tato metoda není v porovnání s našimi chromatografickými parametry vhodná [52]. V opačném případě autoři Moon et al. mají nejdelší dobu analýzy, kterou prováděli za použití jiné kolony, IS a také i jiné gradientní MF. Jejich retenční časy byly 2,27 minut pro busulfan a 4,89 minut pro IS. Jejich injekční objem byl 2 µl a celková doba analýzy byla 10 minut. Z toho vyplývá, že naše metoda je jedna z nejkratších s nejmenším množstvím nastříkovaného vzorku [24].

V případě porovnání naší HPLC metody dosáhli autoři Hara et al. lepších chromatografických podmínek. Busulfan stanovovali pomocí HPLC s FLD. Vnitřní standard byl použit stejný jako ten náš a to 1,6-bis (methansulfonyloxy) hexan, avšak ke chromatografické separaci využili jinou kolonu a také i jinou mobilní fázi. Objem nástriku byl 2 µl a detekce byla provedena při 370 nm s excitací při 255 nm. Retenční čas pro busulfan byl 6,3 minut a pro IS 9,3 minut. Fluorescenční detektor je považován i za citlivější v porovnání s UV detektorem [50].

8. Závěr

V souladu cíli diplomové práce byly srovnány laboratorní vyšetřovací metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) pro stanovení busulfanu. Na základě proměření validačních parametrů při stanovení busulfanu metodami HPLC a LC-MS/MS byly stanoveny jak výhody, tak i nevýhody obou metod a na základě realizace měření patientských vzorků a následným statistickým zpracováním, byla naměřená data obou metod porovnávána z hlediska odlišnosti.

Obě metody jsem testovala z pohledu opakovatelnosti a reprodukovatelnosti. Hodnoty variačních koeficientů u HPLC metody nepřesáhly hranici 8,83 % a u LC-MS/MS metody hranici 4,92 %. Z naměřených hodnot opakovatelnosti a reprodukovatelnosti jsem vypočítala hodnoty bias, které vypovídají o správnosti dané metody. U obou metod žádná z těchto hodnot nepřekročila hranici 10 %. Konkrétně pro HPLC nepřekročila systematická chyba měření hranici 7,13 % a pro LC-MS/MS 2,73 %. Dále jsem provedla stanovení meze detekce a meze kvantifikace. Mez detekce pro určení busulfanu HPLC byla 3,7 ng/ml a mez kvantifikace byla 12,3 ng/ml. Pro LC-MS/MS byla stanovena mez detekce 1,2 ng/ml a mez kvantifikace 12,0 ng/ml. Dle validačních parametrů bylo také provedeno testování robustnosti metod, kde byla zkoumána stabilita vzorku při různých skladování. Hodnoty koncentrací vzorků skladovaných krátkodobě, po dobu 21 dnů při teplotě 4 °C se lišily u HPLC až o 42,63 % a u LC-MS/MS o 47,03 % a při teplotě -18 °C se u HPLC nelišily více jak o 12,21 % a u LC-MS/MS o 8,13 %. Hodnoty koncentrací vzorků skladovaných dlouhodobě, po dobu 3 měsíců se u HPLC nelišily více jak o 15,54 % a u LC-MS/MS víc jak o 8,54 %. Z těchto výsledků byla prokázána robustnost obou metod a také nevhodnost skladování busulfanu při pokojové teplotě z důvodu jeho značné nestability.

Na základě těchto validačních parametrů lze konstatovat, že obě metody jsou přesné, správné a robustní, avšak metoda LC-MS/MS v porovnání s metodou HPLC prokazuje podstatně spolehlivější analytickou metodu a zároveň tak demonstruje i její vyšší kvalitu. Z validačních parametrů je zřejmé, že obě metody byly úspěšně validovány, ale až mezilaboratorní porovnání ukázalo, že HPLC analýza se u některých vzorků značně lišila a tím bylo poukázáno na důležitost externí kontroly kvality. Z hlediska časové náročnosti u LC-MS/MS metody je výhodou, že zde odpadá zdlouhavý a časově náročný krok derivatizace vzorku. Další velikou výhodou je možnost analýzy z malého objemu, což je velkým přínosem obzvláště pro pediatrické pacienty. Objem séra potřebný pro HPLC analýzu je 700 µl a pro LC-MS/MS analýzu je zapotřebí pouhých 50 µl. Dalším kladem LC-MS/MS analýzy je rychlé a přesné měření busulfanu při monitorování klinických léčiv. Čas potřebný pro HPLC analýzu vzorku byl 18 minut a pro LC-MS/MS pouhých 4,5 minut.

Dále bylo provedeno měření u 26 pediatrických pacientů, čímž bylo získáno 204 patientských vzorků pro HPLC a LC-MS/MS metodu.

Statistickým porovnáním výsledků koncentrací naměřených HPLC a LC-MS/MS jsem zjistila statisticky významný rozdíl mezi naměřenými koncentracemi busulfanu. Tato skutečnost může být způsobena nestejnou derivatizací busulfanu během přípravy vzorků u HPLC metody.

9. Použitá literatura

- [1] ŠÁLEK, Cyril. *Diagnostika a léčba akutních leukemií. Interní medicína pro praxi* [online]. Praha, 2012, 14(10), 366-372 [cit. 2018-11-07]. Dostupné také z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/10/05.pdf>
- [2] KARAS, Michal. Akutní myeloidní leukemie u nemocných nad 60 let, možnosti její léčby a potenciální role alogenní transplantace krvetvorných buněk. *Onkologie* [online]. Plzeň, 2011, 5(2), 91-95 [cit. 2018-11-07]. Dostupné také z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2011/02/08.pdf>
- [3] PENKA, Miroslav, Eva TESAŘOVÁ a kolektiv. *Hematologie a transfuzní lékařství I: Hematologie*. Praha: Grada, 2011, 289-310. ISBN 978-80-247-7192-2.
- [4] BAJČIOVÁ, Viera, Tomášek JIŘÍ, Jaroslav ŠTĚRBA a kolektiv. *Nádory adolescentů a mladých dospělých*. Praha: Grada, 2011, 53-64. ISBN 978-80-247-3554-2.
- [5] Adult Acute Myeloid Leukemia Treatment (PDQ®) – Patient Version-National Cancer Institute [online]. USA: National Cancer Institute, 2018 [cit. 2018-11-10]. Dostupné také z: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/adult-aml-treatment-pdq>
- [6] ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ, Jiří VORLÍČEK a kolektiv. *Hematologie-Přehled maligních hematologických nemocí*. 2., doplněné a zcela přepracované vydání. Praha: Grada, 2008, 29-40. ISBN 978-80-247-2502-4.
- [7] Acute Myeloid Leukemia (AML) Subtypes and Prognostic Factors [online]. Atlanta: American Cancer Society, 2018 [cit. 2018-11-07]. Dostupné také z: <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/detection-diagnosis-staging/how-classified.html>
- [8] DESCHLER, Barbara a Michael LÜBBERT. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer* [online]. 9. 2006, 107, 2099-2107 [cit. 2018-11-07]. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cncr.22233>
- [9] Nové poznatky mohou zásadně zefektivnit léta používanou léčbu AML. MEDICAL TRIBUNE CZ> Nové poznatky mohou zásadně zefektivnit léta používanou léčbu AML [online]. Praha: MEDICAL TRIBUNE CZ, s.r.o. a dodavatelé obsahu (ČTK), 2017 [cit. 2018-11-11]. Dostupné také z: <https://www.tribune.cz/clanek/41682-nove-poznatky-mohou-zasadne-zefektivnit-leta-pouzivanou-lecbu-aml>
- [10] TEMPLETON, Amelia. OHSU Researchers Hope Gene Sequencing Will Help Beat Complex Form of Leukemia [online]. Oregon, 2015 [cit. 2018-11-07]. Dostupné také z: <https://www.opb.org/news/article/ohsu-researchers-hope-gene-sequencing-will-help-beat-complex-form-of-leukemia/>
- [11] Adult Acute Myeloid Leukemia Treatment (PDQ®) – Health Professional Version-National Cancer Institute [online]. USA: National Cancer Institute, 2018 [cit. 2018-11-10]. Dostupné také z: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/adult-aml-treatment-pdq>
- [12] MOLLOY, Tim. Arrow grant helps in developing new therapies and diagnostic tests [online]. Sydney: Arrow Bone Marrow Transplant Foundation, 2018 [cit. 2018-11-07]. Dostupné také

z: <http://arrow.org.au/arrow-grant-helps-developing-new-therapies-diagnostic-tests/>

[13] ADAM, Zdeněk, Jiří VORLÍČEK, Jiří VANÍČEK a kolektiv. *Diagnosticke a léčebné postupy u maligních chorob*. Druhé, aktualizované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2004, 372-378. ISBN 978-80-247-7762-7.

[14] Tests for Acute Myeloid Leukemia (AML) [online]. Atlanta: American Cancer Society, 2018 [cit. 2018-11-05]. Dostupné také z: <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>

[15] HILDRETH, Carolyn J., Cassio LYNM a Richard M. GLASS. Acute Myeloid Leukemia [online]. JAMA, 2010, 304(24), 2759 s. [cit. 2018-11-10]. doi: 10.1001/jama.302.22.2759. Dostupné také z: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/187116>

[16] MAYER, Jiří. *Léčebné postupy v hematologii: doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. Praha: Česká hematologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně, 2016. ISBN 978-80-260-9718-1.

[17] FLANDRIN, Georges. Classification of acute myeloid leukemias. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* [online]. 2002, 6(3) [cit. 2018-11-20]. DOI: <https://doi.org/10.4267/2042/37875>. Dostupné z: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/ClassifAMLID1238.html>

[18] GAZDOVÁ, J., D. DVOŘÁKOVÁ, F. RÁZGA, T. JURČEK a J. MAYER. Úloha FLT3 mutací v patogenezi akutní myeloidní leukemie. *Razga_FLT3.pdf* [online]. *Transfúze a Hematologie Dnes*, 2009, 15(4), 229–236 [cit. 2018-11-21]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/281062281_Uloha_FLT3_mutaci_v_patogenezi_akutni_myeloidni_leukemie

[19] SLOVÁČEK, Ladislav, Ladislav JEBAVÝ, Martin BLAŽEK, Miloslav KMONÍČEK a Pavel ŽÁK. *Transplantace kostní dřeně*. *Vojenské zdravotnické listy* [online]. 2005, LXXIV (3-4), 125-134 [cit. 2018-12-05]. Dostupné také z: http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL%203_4_2005/005-Slov%C3%A1cek.pdf

[20] TESFAYE, Hundie et al. The importance of therapeutic drug monitoring (TDM) for parenteral busulfan dosing in conditioning regimen for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children. *Annals of transplantation*. 2014, 19, 214-224. DOI: 10.12659/AOT.889933. ISSN 1425-9524.

[21] HRADECKÁ, Adéla. *Apoptóza a proliferace v testikulární tkáni po experimentální poškození* [online]. Hradec Králové, 2006 [cit. 2018-12-15]. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/20.500.11956/6199>. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

[22] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: *Pharmaceuticals*. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, No. 100 A. Lyon, Francie: International Agency for Research on Cancer, 2012. ISBN 978-92-832-1318-5.

[23] FISHER, Vicki L., Yvonne J. BARNES a Suzanne L. NUSS. Pretransplant conditioning in adults and children: dose assurance with intravenous busulfan. *Oncology nursing forum*. 2006, 33(2), E36-E43. DOI: 10.1188/06.ONF.E36-E43. ISSN 0190- 535X.

- [24] MOON, Soo Young et al. Quantification of Human Plasma-Busulfan Concentration by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Ann Lab Med.* 2014, 34(1), 7-14. DOI: 10.3343/alm.2014.34.1.7.
- [25] TESFAYE, H., E. KLAPKOVA a R. PRUSA. Area under the concentration-time curve (AUC) based busulfan exposure monitoring in pediatric patients. 2009, 215-219.
- [26] PHILIPPE, M., et al. Should Busulfan Therapeutic Range be Narrowed in Pediatrics? Experience from a Large Cohort of Hematopoietic Stem Cell Transplant Children. *Bone Marrow Transplantation.* London, 2016, 51(1), 72-78. DOI: 10.1038/bmt.2015.218. ISSN 02683369.
- [27] ALISON, M Gulbis, S Culotta KIRK, B Jones ROY a Andersson BORJE. Busulfan and Metronidazole: An Often Forgotten but Significant Drug Interaction. *Annals of Pharmacotherapy.* 2011, 45, e39. DOI: 10.1345/aph.1Q087.
- [28] KLENER, Pavel jr. a Pavel KLENER. *Konvenční protinádorová léčba. Principy systémové protinádorové léčby.* Praha: Grada Publishing, 2013, s. 51-52. ISBN 978-80-247-4171-0.
- [29] ŠVIHOVEC, Jan a kol. *Protinádorová terapie.* Farmakologie. Praha: Grada Publishing, 2018, s. 633-637. ISBN 978-80-271-2150-2.
- [30] HOUOT, Mélanie et al. Physico-Chemical Stability of Busulfan in Injectable Solutions in Various Administration Packages. *Drugs in R&D.* Springer International Publishing, 2013, 13(1), 87-94. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40268-013-0003-y>. ISSN 1179-6901.
- [31] MYLERAN 2MG Potahovaná tableta. MYLERAN 2MG Potahovaná tableta-Databáze léčiv [online]. Slovenia: Mediatelly, 2018 [cit. 2018-12-27]. Dostupné také z: <https://mediatelly.co/cz/drugs/PZQMzByyRW44JdXt447LhIpXKmt/myleran-2mg-potahovana-tableta#packagings>
- [32] BUSULFAN ACCORD 6MG/ML Koncentrát pro infúzní roztok. BUSULFAN ACCORD 6MG/ML Koncentrát pro infúzní roztok-Databáze léčiv [online]. Slovenia: Mediatelly, 2018 [cit. 2018-12-27]. Dostupné také z: <https://mediatelly.co/cz/drugs/8tM6MZHbKZjnTFDoi9RNRbQXHEy/busulfan-accord-6mg-ml-koncentrat-pro-infuzni-roztok>
- [33] HEINEMANN, V. et al. *Busulfan Pharmacology in Bone Marrow Transplantation Patients.* BÜCHNER, T., G. SCHELLONG, J. RITTER, U. CREUTZIG, W. HIDDEMANN a B. WÖRMANN. Acute Leukemias VI. Haematology and Blood Transfusion / Hämatologie und Bluttransfusion. 38. Berlin, Heidelberg: Springer, 1997, s. 533-537. DOI: 10.1007/978-3-642-60377-8_84. ISBN 978-3-642-60377-8.
- [34] KIM, Amy H. Evaluating pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous busulfan in pediatric patients receiving bone marrow transplantation. *Pediatric transplantation.* 2009, 13(8), 971-976. DOI: 10.1111/j.1399-3046.2008.01098.x. ISSN 1397-3142.
- [35] STANTON, Gerson L., Caimi F. PAOLO, William M. BASEM a Creger J. RICHARD. Pharmacology and Molecular Mechanisms of Antineoplastic Agents for Hematologic Malignancies. HOFFMAN, Ronald et al. *Hematology.* 7th ed. Elsevier, 2018, s. 849-912. DOI: 10.1016/C2013-0-23355-9. ISBN 978-0-323-35762-3.

- [36] VÍTKA, Štefan, Jiří LÁCHA a Ondřej VIKLICKÝ. *Transplantace ledviny*. TESAŘ, Vladimír a Otto SCHÜCK. Klinická nefrologie. Praha: Grada, 2006, s. 599-600. ISBN 80-247-0503-6.
- [37] TESFAYE, Hundie. *Terapeutické monitorování léčiv – klinické poznámky k vybraným skupinám léčiv*. Remedia [online]. 2014, 24(5), 387-395 [cit. 2019-01-06]. Dostupné také z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Klinicka-farmacie/Terapeuticke-monitorovani-leciv-klinicke-poznamky-k-vybranim-skupinam-leciv/6-1xn-1KU.magarticle.aspx>
- [38] CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8.
- [39] BROWN, Phyllis R. *HPLC in nucleic acid research: methods and applications*. New York: M. Dekker, c1984, 424 s. ISBN 08-247-7236-9.
- [40] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Hradec Králové: Nováková Lucie, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [41] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [42] LIN, Hongxia, a et al. Comparison of LC-MS Assay and HPLC Assay of Busulfan in Clinical Pharmacokinetics Studies. *ISRN Analytical Chemistry* [online]. 2012, 1-5 [cit. 2019-03-09]. DOI: <http://dx.doi.org/10.5402/2012/198683>. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/198683/cta/>
- [43] FRIEDECKÝ, Bedřich a Karel LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, 20(3), 152-157. ISSN 1210-7921. Dostupné také z: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=casopisy--kbm--casopisy-kbm-archiv>
- [44] GREBE, S. K. a R. J. SINGH. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here? *The Clinical Biochemist Review*. 2011, 32(1), 5-31. ISSN 0159-8090. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3052391/>
- [45] PITT, J. J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Review*. 2009, 30(1), 19-34. ISSN 0159-8090. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643089/>
- [46] TAYLOR, Paul J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*. 2005, 38(4), 328–334. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007.
- [47] HOLČAPEK, M., L. KOLÁŘOVÁ a M. NOBILIS. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008, 391(1), 59–78. DOI: 10.1007/s00216-008-1962-7.
- [48] DEEG, H.J. a et al. Myeloablation by intravenous busulfan and hematopoietic reconstitution with autologous marrow in a canine model. American Society for Blood and Marrow Transplantation. 1999, 5(5), 316-321.
- [49] HARA, Shuuji a et al. High-Performance Liquid Chromatographic Quantification of Busulfan in Human Serum after Fluorescence Derivatization by 2-Naphthalenethiol. *Analytical Sciences*.

2000, 16(3), 287-291. DOI: <https://doi.org/10.2116/analsci.16.287>.

[50] NAVARRO, M. A. Moreno, A. Moreno GALVEZ a L. Moreno GALVEZ. An HPLC method for the determination of busulfan in biological samples. *Analytical Chemistry*. 2011, 10(3), 149-152. ISSN 0974-7419.

[51] REWARIA, S. a B. SWAMY. Analytical Method Development & Validation for Assay Method of Busulfan Injection by RP-HPLC Method. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS)*. 2013, 2(2), 20–26. ISSN 2277-7873.

[52] DOS REIS, Ederson Oliveira a et al. Development of a rapid and specific assay for detection of busulfan in human plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2005, 19(12), 1666-1674. DOI: <https://doi.org/10.1002/rcm.1962>.

[53] HONGXIA, Lin et al. Comparison of LC-MS Assay and HPLC Assay of Busulfan in Clinical Pharmacokinetics Studies. *ISRN Analytical Chemistry*. 2012, 2012, 5. DOI: <http://dx.doi.org/10.5402/2012/198683>.

[54] ANSARI, Marc a et al. A simplified method for busulfan monitoring using dried blood spot in combination with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2012, 26(12), 1437-1446. DOI: <https://doi.org/10.1002/rcm.6241>.

[55] DESIRE, Salamun a et al. A rapid & sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of busulfan levels in plasma & application for routine therapeutic monitoring in haematopoietic stem cell transplantation. *Indian J Med Res*. 2013, 137(4), 777-784.

[56] IALONGO, Cristiano, Alessia Francesca MOZZI a Sergio BERNARDINI. An LC-MS Assay with Isocratic Separation and On-line Solid Phase Extraction to Improve the Routine Therapeutic Drug Monitoring of Busulfan in Plasma. *Journal of Medical Biochemistry*. 2017, 36(2), 113–121. DOI: 10.1515/jomb-2016-0031.

[57] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. New Hampshire Ave., Silver Spring: U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2013. Dostupné také z: <https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/guidances-drugs>